

Individuelle Edelmetall-Nanopartikel als optische Biosensoren für die DNA- und Protein-Analytik

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena

von Diplombiologe Thomas Schneider
geboren am 8. August 1981 in Werdau

Gutachter:

Prof. Dr. Frank-Dietmar Böhmer

*Friedrich-Schiller-Universität Jena
Hans-Knöll-Str. 2, D-07745 Jena*

PD Dr. Wolfgang Fritzsche

*Institut für Photonische Technologien
Albert-Einstein-Str. 9, D-07745 Jena*

Prof. Dr. Frank F. Bier

*Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik
Am Mühlenberg 13, D-14476 Potsdam*

Dissertation eingereicht am:

07.06.2012

Tag der öffentlichen Verteidigung:

26.11.2012

“The distance between insanity and genius is measured only by success.”

Bruce Feirstein

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Biosensoren.....	3
2.1.1. Definition Biosensor.....	3
2.1.2. Biochemische Erkennungsprinzipien	4
2.1.3. Prinzipien der Signalgenerierung	6
2.1.3.1. Kalorimetrische Biosensoren	6
2.1.3.2. Piezoelektrische Biosensoren.....	6
2.1.3.3. Elektrochemische Biosensoren	7
2.1.3.4. Optische Biosensoren.....	8
2.2. Oberflächenplasmonresonanz	9
2.2.1. Propagierende Oberflächenplasmonresonanz (SPR).....	9
2.2.1.1. Theoretischen Grundlagen der Oberflächenplasmonresonanz.....	9
2.2.1.2. Messprinzip der SPR-Spektroskopie.....	12
2.2.1.3. Anwendungsgebiete der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	13
2.2.1.4. Vor- und Nachteile konventioneller SPR-Spektroskopie.....	14
2.2.2. Lokalisierte Oberflächenplasmonresonanz (LSPR)	16
2.2.2.1. Partikelplasmonen (lokalisierte Oberflächenplasmonen).....	16
2.2.2.2. Dielektrische Eigenschaften von Nanopartikeln	18
2.2.2.3. Resonanzverschiebung durch molekulare Bindeereignisse	20
2.2.2.4. LSPR-Sensorik an Partikel-Ensembles.....	22
2.2.2.5. Einzelpartikelsensorik	24
2.3. Zielstellung	26
3. Materialien und Methoden	27
3.1. Materialien	27
3.1.1. Chemikalien.....	27
3.1.2. Puffer/Lösungen	27
3.1.3. Nanopartikel	27
3.1.4. Oligonukleotide	29

3.1.5.	Proteine/Peptide.....	30
3.1.6.	Substrate	30
3.1.7.	Geräte/Software	31
3.2.	Methoden	32
3.2.1.	Substratpräparation.....	32
3.2.1.1.	Reinigung der Chromgitter-Chips.....	32
3.2.1.2.	Silanisierung der Chromgitter-Chips	32
3.2.1.3.	Immobilisierung der Nanopartikel	33
3.2.1.4.	Vorbehandlung der SPR-Chips	33
3.2.2.	Funktionalisierung von Goldoberflächen	33
3.2.2.1.	Selbstorganisierende Monolagen	34
3.2.2.2.	Anbindung von Antikörpern	36
3.2.3.	Anbindung der Analytmoleküle	37
3.2.3.1.	DNA-Hybridisierung.....	37
3.2.3.2.	Anbindung von Proteinen (Antigenen)	37
3.2.4.	Charakterisierung.....	38
3.2.4.1.	Rasterkraftmikroskopie	38
3.2.4.2.	Rasterelektronenmikroskopie.....	39
3.2.4.3.	Dunkelfeldmikroskopie.....	39
3.2.5.	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	40
3.2.6.	Mikrospektroskopie.....	42
3.2.6.1.	Hintergrund und Prinzip.....	42
3.2.6.2.	Aufbau Mikrospektroskopie.....	43
3.2.6.3.	Datenanalyse der Streuspektren	45
3.2.6.4.	Sensitivität und <i>Figure of Merit</i> von Nanopartikeln	47
4.	Ergebnisse	49
4.1.	Grenzen der Mikrospektroskopie	49
4.1.1.	Signalstabilität über die Zeit.....	50
4.1.2.	Signalstabilität nach Wasch- und Anbindungsschritten	50
4.1.3.	Einfluss von Verunreinigungen.....	52
4.1.4.	Einfluss der x-y-z-Position des Nanopartikels im Messbereich.....	53
4.2.	Vergleich der Streueigenschaften von plasmonischen Nanostrukturen	54
4.2.1.	Spektrale Linienbreite	57

4.3. Optimierung der Biofunktionalisierung des Transducers	58
4.3.1. Theoretische Betrachtung der Partikelfunktionalisierung	58
4.3.2. Funktionalisierung von Nanopartikeln mit einzelsträngiger Fänger-DNA	63
4.4. Bioanalytische Anwendung	65
4.4.1. Qualitativer Nachweis von DNA	66
4.4.2. Quantitativer Nachweis von DNA	68
4.4.3. Verstärkung des Sensorsignals	69
4.4.4. DNA-Sandwich-System	71
4.4.5. Nachweis von Phytophthora-Arten - Biologische Applikation	73
4.4.6. Sensitivitätsvergleich der Nanopartikel mit EBL-strukturierten Transducern ...	75
4.4.7. Qualitativer Nachweis von Proteinen	76
4.5. Vergleich LSPR - SPR	79
5. Diskussion	85
5.1. Grenzen der Einzelpartikelspektroskopie	85
5.2. Optische Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln	86
5.3. Biosensorik auf Nanopartikeln - Theoretische Betrachtung	88
5.4. (Bio-) Funktionalisierung des Signalwandlers	89
5.5. Detektion von DNA-Hybridisierungsereignissen auf Einzelpartikelebene	90
5.5.1. Nachweis von Hybridisierungsereignissen und Detektionslimit	90
5.5.2. DNA-Sandwich-System	91
5.5.3. Biologisch relevante Anwendungsbereiche der Einzelpartikelsensorik	93
5.5.4. Signalverstärkung	93
5.5.5. Mögliche Transducer-Alternativen	94
5.6. Vergleich von LSPR und SPR	95
6. Literaturverzeichnis	97

1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential eines optischen Biosensors für die DNA- (und auch Protein-) Analytik untersucht. Als Signalwandler kamen individuelle Edelmetall-Nanopartikel zum Einsatz, deren besondere optische Eigenschaften durch die Anregung von lokalisierten Oberflächenplasmonen hervorgerufen werden. Je nach Form, Größe und Material besonders Edelmetall-Nanopartikel ausgeprägte Plasmonresonanzen im sichtbaren Wellenlängenbereich. Auch die Interaktion von Biomolekülen nahe der Partikeloberfläche kann dabei die optischen Eigenschaften beeinflussen. Die durch biomolekulare Wechselwirkungen verursachte Brechungsindexänderung in der lokalen Partikelumgebung resultierte dabei in einer Verschiebung der Resonanzposition. Die Detektion der Resonanzänderung erfolgte durch Erfassen des Streulichts mittels kombinierter Dunkelfeldmikroskopie-Mikrospektroskopie, wobei die Lage der Resonanzposition und die spektrale Linienbreite der Streuspektren als Messsignale ausgewertet wurden. Das Potential des hier verwendeten Einzelpartikelsensors in Form von Goldkugeln (80 nm Durchmesser) wurde für den Nachweis von Hybridisierungsereignissen von einzelsträngiger DNA getestet. Neben unterschiedlichen Funktionalisierungsstrategien für die Steigerung der Hybridisierungseffizienz wurde das Detektionslimit (ca. 2100 DNA-Moleküle) für diese Methode bestimmt. Die Spezifität dieses Sensors wurde für ein in der chipbasierten DNA-Analytik relevantes DNA-Sandwich-System gezeigt und als bioanalytische Applikation für die Unterscheidung von Pflanzenschädlingarten untersucht, wobei zwei Arten des Pflanzenschädlings *Phytophthora* (*P. ramorum* und *P. kernoviae*) mit Hilfe von individuellen Goldnanopartikeln verlässlich nachgewiesen werden konnten. Auch die spezifische Detektion von Rinderserumalbumin (BSA) war durch Antikörper-funktionalisierte Nanopartikel mit Hilfe der Einzelpartikelsensorik möglich. Zwei Möglichkeiten der Signalverstärkung wurden durch die Anbindung von Streptavidin-modifizierten Goldnanopartikeln und der Verwendung verschiedener Transducer untersucht. Einerseits konnte das zusätzliche Anbinden von Goldnanopartikel eine Verdopplung des Signals bewirken, während andererseits eine starke Signalamplifikation durch die Verwendung von lithographisch hergestellten Signalwandlern (Ring-, Scheiben- und Spaltringstrukturen) erreicht wurde. Die EBL-strukturierten Nanopartikel konnten durch ihre hohen Sensitivitäten und FOMs eine zusätzliche Steigerung der Sensorqualität bewirken, die im Vergleich zu anderen Sensorarten einen großen Vorteil bieten könnten. Abschließend wurde der Einzelpartikelsen-

sorik mit der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) eine kommerziell etablierte Methode gegenübergestellt, wobei besonders die Grenzen und die Spezifität beider Nachweismethoden für die DNA-Analytik im Mittelpunkt standen. Hier konnte deutlich die kleine Sensoroberfläche des Nanosensors überzeugen, wodurch besonders das Multiplexing (Parallelisierung) und die Miniaturisierung dieses optischen Biosensors einen großen Vorteil besonders für die chipbasierte DNA- und Protein-Analytik eröffnen. Die Vielzahl an unterschiedlichen einsetzbaren Partikelformen, -größen und -materialien ermöglicht dadurch ein großes Potential für die biosensorische Anwendungen.

2. Einleitung

2.1. Biosensoren

Der Nachweis von Schadstoffen im Trinkwasser, Viren im Blut oder die Produktreinheit von Medikamenten – für die Lösung all dieser Aufgaben werden Biosensoren eingesetzt und deren Verwendung ist aus dem diagnostischen Sektor nicht mehr wegzudenken. Vor allem das Auftreten von Tierseuchen wie Rinderwahn (BSE-Krise 2000), Vogelgrippe (Ausbreitung des H5N1-Erregers 2005) und Maul- und Klauenseuche (MKS-Krise 2007) haben die Notwendigkeit einer einfachen, schnellen und auch günstigen Nachweismethode zur spezifischen Detektion von Krankheitserregern, mit großem Potenzial zur Miniaturisierung und Parallelisierung für das Hochdurchsatz-Screening, verdeutlicht. Auch das Auftreten eines neuen, aggressiven Stammes der Gattung *enterohämorrhagisches Escherichia coli*, kurz EHEC, der beim Menschen Darmerkrankungen auslöst, rücken schnelle und zuverlässige Nachweismethoden zur Bestimmung von Krankheitserregern, sowie medizinisch, ökologisch oder trophologisch relevanter Substanzen, in den Fokus der Öffentlichkeit. Um durch einen hohen Probendurchsatz in kürzester Zeit auf eine sichere Diagnose zu kommen, sind einfache automatisier- und parallelisierbare Methoden notwendig. Der Gebrauch von Biosensoren stellt bei der Lösung dieser Problematik eine mögliche Alternative dar.

2.1.1. Definition Biosensor

Unter einem Biosensor wird im Allgemeinen ein Messsystem verstanden, bei dem ein biologisches Erkennungselement (Rezeptor) räumlich eng an einen geeigneten Signalwandler, den sogenannten Transducer, gekoppelt ist. Findet zwischen den nachzuweisenden Analytmolekülen und den selektiven Erkennungselementen eine spezifische Wechselwirkung statt, wird ein physikochemisches Signal erzeugt, welches durch den Transducer in ein optisch bzw. elektrisch auswertbares Messsignal umgewandelt wird [IUPAC 1996]. Das Sensorprinzip ist in Abbildung 2.1 veranschaulicht.

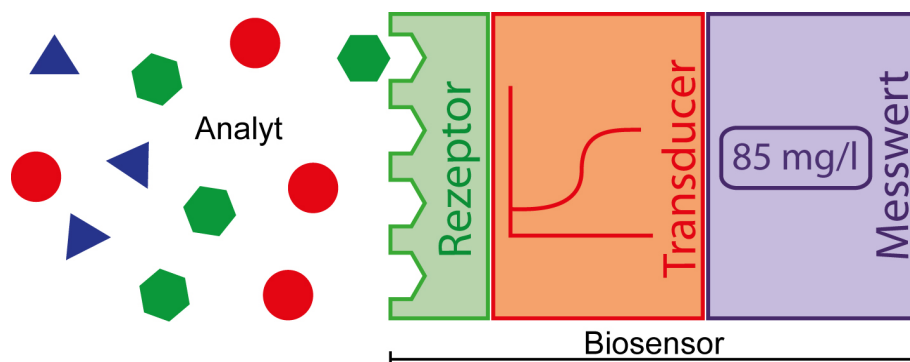


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Wirkprinzips von Biosensoren.

Das Erkennungselement muss dabei nicht zwingend biologischer Natur sein, da auch biometrische oder synthetisch hergestellte Rezeptoren in der Biosensorik verwendet werden können. Anwendung finden Biosensoren heutzutage insbesondere in der klinischen Diagnostik zur Bestimmung von Stoffwechselprodukten, Pharmazeutika und Krankheitsmarkern, sie werden aber auch als sogenannte „künstliche Nasen“ in der Lebensmittelanalytik zur Qualitätssicherung von Nahrungsmitteln eingesetzt. Neben Aussagen über den pH-Wert und dem Vorhandensein von Toxinen, erhält man auch Informationen zu Duft, Aroma und Frische der untersuchten Waren. Auch in anderen Gebieten wie der Umweltanalytik (Analyse von Trinkwasser, Nachweis von Pestiziden und Schadstoffen), der Sicherheitstechnik sowie der Prozesskontrolle gelangen Biosensoren zu immer größerer Bedeutung. Die Art des Transducers sowie die Wahl der biologischen Komponente erlaubt dabei eine Einteilung der Biosensoren.

2.1.2. Biochemische Erkennungsprinzipien

Die Klassifizierung von Biosensoren kann nach der Art der biologischen bzw. chemischen Wechselwirkung an der Sensoroberfläche erfolgen. Prinzipiell unterscheidet man enzymatische Sensoren, Immunosensoren, rezeptorvermittelte Sensoren, Sensoren zur Sequenzanalyse von Nukleinsäuren und Sensoren zur Erkennung bestimmter Kohlenhydrate. Diese Einteilung erscheint sinnvoll, da sie die Schwerpunkte der gegenwärtigen Forschungsarbeiten umreißt. Daneben gibt es natürlich eine Vielzahl von Kombinationen der verschiedenen Sensorprinzipien. Beispielsweise werden Methoden der Immunochemie mit denen der enzymatischen Analyse kombiniert, welche die Bestimmung von Antigenen, Antikörpern und Haptenen ermöglichen. Die nachfolgende Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die Wirkprinzipien von Biosensoren, die meistverwendeten Transducer und einige aktuelle Beispiele.

Wechselwirkung	Anwendungsbeispiele
Enzym/Substrat	<ul style="list-style-type: none"> • enzymatischer Cholesterol-Nachweis [Ahmadalinezhad 2011] • Analyse Dopamin- und Tyrosinase-Aktivität [Freeman 2007] • Harnstoffnachweis in verdorbener Milch [Mishra 2010] • Proteinase-Aktivitätsmessung an Gelatine-modifizierten Nanopartikeln [Chuang 2010]
Antigen/Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • Detektion von HIV-2-Antikörpern [Sheikh 2011] • Antikörpernachweis des karzinoembryonischen Antigens (CEA) [Shi 2011] • Antigen-induzierte Mastzell-Aktivierung [Pizziconi 1997] • Detektion des Erdnuss-Allergens [Pollet 2011]
Rezeptoren/Pharmazeutische Wirkstoffe	<ul style="list-style-type: none"> • Modulation der Katecholamin-Sekretion durch Neurotransmitter [Koh 1997] • Membransensor gegen Histon H1-Rezeptor-Antagonisten Fexofenadine [Abbas 2004]
Nukleinsäure/Nukleinsäure	<ul style="list-style-type: none"> • DNA-Nachweis über eine Endonuklease/Nanopartikel-Verstärkung [Fei 2011] • DNA-Nachweis über Streptavidin-HRP-funktionalisierte Karbon-Nanoröhrchen [Gao 2011] • elektrochemische Detektion der DNA-Hybridisierung [Du 2010] • Detektion von transgener DNA über SPR-Imaging [Scarano 2011]
Proteine/Kohlenhydrate	<ul style="list-style-type: none"> • Nicht-enzymatische Glucose-Detektion [Xia 2011] • Verstärkung des Glucose-Nachweises über Ladungstransfer-Techniken [Lee 2008]

Tabelle 2.1: Substanzen zur biologischen Erkennung und ausgewählte Anwendungsbeispiele mit biologisch relevanten Systemen.

2.1.3. Prinzipien der Signalgenerierung

Bei der Einteilung von Biosensoren unterscheidet man nach ihrem Interaktionsweg zwei Wirkprinzipien. Bei katalytischen Biosensoren fördern Enzyme, Mikroorganismen oder auch Organellen chemische Reaktionen, wodurch sich die Massebilanz an der Sensoroberfläche auf Grund von nachgelagerten Reaktionen verändert. Kommt es zu einer spezifischen Bindung des Analyten, bei der ausschließlich die direkte Kopplung an eine Grenzfläche untersucht wird, so spricht man von Affinitätsbiosensoren. Entsprechend den biochemischen Wirkungsmechanismen müssen die Signalwandler für ein bestimmtes biologisches System ausgewählt werden. Derzeit steht eine Vielzahl geeigneter Wandler zur Verfügung, die in nachfolgender Abbildung 2.2 zusammengefasst sind.

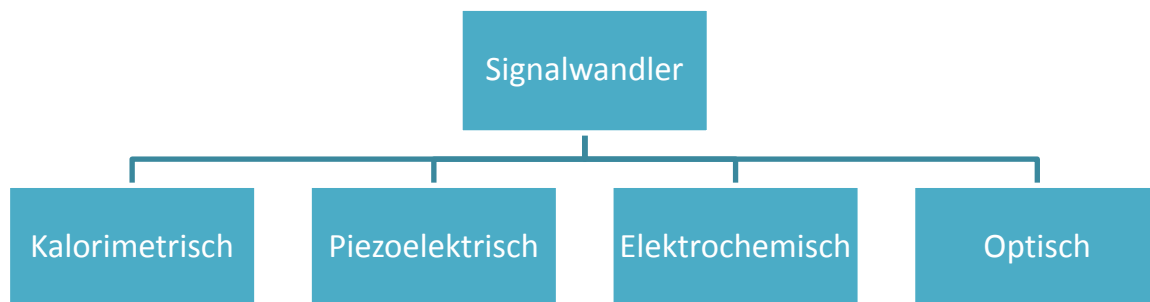


Abbildung 2.2: Klassifizierung von Biosensoren nach Art des verwendeten Signalwandlers.

2.1.3.1. Kalorimetrische Biosensoren

Die Wärmemessung bei exothermen chemischen Reaktionen bildet die Grundlage dieses Sensorprinzips. Hierbei wird die entstehende Reaktionswärme in einem gut isolierten Volumen durch einen Halbleiter-Thermistor detektiert. Ein Thermistor registriert die bei enzymatischen Reaktionen freigesetzte Wärmemenge, die sich umgekehrt proportional zur Konzentration des Substrats verhält [Ramanathan 2001]. Eine Anwendung hierfür ist die Glucosebestimmung im Blutserum durch das Enzym Glucose-Oxidase, wobei die gemessene Temperaturänderung für die jeweilige Konzentration an Glucose charakteristisch ist [Danielsson 1977].

2.1.3.2. Piezoelektrische Biosensoren

Zur Verfolgung von Molekülanbindungen an Grenzflächen in Echtzeit stehen verschiedene akustische Methoden zur Verfügung, die die Ausbreitung akustischer Wellen in einem piezoelektrischen Substrat oder entlang der Oberfläche eines piezoelektrischen Substrats messen. Als akustische Wellen werden, sich longitudinal zu einer Oberfläche ausbreitende, Schallwel-

len bezeichnet, die durch Belegung mit Fremdschichten, durch Adsorption von Analyten an Substratgrenzflächen und durch verschiedene Eigenschaften des umgebenden Mediums beeinflusst werden. Als sensorisches Signal erhält man entweder Verschiebungen der Resonanzfrequenz (proportional zu Massebeladungen) oder Änderungen der Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Welle. Insbesondere für den Nachweis von immunologischen Interaktionen kommen Sensoren zum Einsatz, die auf den piezoelektrischen Eigenschaften von Schwingquarzen (Quarzkristall-Mikrowaagen, *engl. QCM – Quartz crystal microbalance*) [Zhang 2008] oder auf der Ausbreitung von akustischen Oberflächenwellen beruhen [Grone-wold 2007].

2.1.3.3. Elektrochemische Biosensoren

Der erste Biosensor überhaupt war ein elektrochemischer Sensor für Diabetiker, um die Glucosekonzentration im Blut zu bestimmen [Clark 1962]. Auch heute noch stellen die elektrochemischen Methoden einen Schwerpunkt wissenschaftlicher Veröffentlichungen im Bereich Sensorik dar. Man unterscheidet hierbei zwischen potentiometrischen, amperometrischen und konduktometrischen Sensoren.

Sensorart	Prinzip	Anwendung
Potentiometrie	Messung des Redoxpotentials zwischen zwei Elektroden	Nachweis bestimmter Ionenkonzentrationen [Dzyadevych 2006]
Amperometrie	Detektion der Änderung des Oxidationszustandes bei biochemischen Reaktionen über Messung des Stromverlaufs	Untersuchung von Adsorptionseffekten [Ikariyama 1985], Blutzuckernachweis [Enfors 1981], Nachweis von Sauerstoffverbindungen [Rahni 1986]
Konduktometrie	Messung des Widerstandes zur Bestimmung der elektrolytischen Leitfähigkeit von Lösungen	selektive Bestimmung von Schwermetallionen [Soldatkin 2011], Detektion spezifischer Antikörper [Okafor 2008]

Tabelle 2.2: Gliederung der elektrochemischen Biosensoren nach ihrem Wirkprinzip.

2.1.3.4. Optische Biosensoren

Die letzte große Gruppe unter den Biosensoren bilden optische Analyseverfahren. Die Anwendung optischer Prinzipien für sensorische Zwecke, d.h. die Charakterisierung (bio-) chemischer Substanzen anhand der Absorption elektromagnetischer Strahlung benötigt einen geeigneten Transducer, der in direktem räumlichen Kontakt mit der zu untersuchenden Substanz stehen. Geeignete Signalwandler sind beispielsweise optische Fasern, die in verschiedenen Modifikationen als photometrische Sensoren eingesetzt werden können [Drapp 1992]. Angewendet werden präparierte Lichtwellenleiter, z.B. zum Nachweis von Penicillin [Fuh 1988], Glucose [Trettnak 1989], Lactat [Wangsa 1988] und Immunosensoren [Cooper 1988]. Neben den faseroptischen Verfahren etablierte sich in den letzten Jahren vor allem die Methode der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (*engl. surface plasmon resonance spectroscopy*, SPRS) als ein hochsensitives optisches Verfahren zur Untersuchung von Adhäsionsprozessen an fest/flüssig Grenzflächen. Erstmals 1983 beschrieben [Liedberg 1983], hat sich diese markierungsfreie Nachweismethode für biomolekulare Fragestellungen zur Echtzeitverfolgung von Bindeereignissen als besonders interessanter Ansatz herausgestellt. Bei dieser Methode nutzt man die Anregung von Oberflächenplasmonen (Definition siehe Abschnitt 2.2.1.1.) an einer Grenzfläche zwischen einem Metall und einer dielektrischen Schicht, um über Brechungsindexänderungen, die durch Interaktion von (Bio-) Molekülen bedingt werden, eine Änderung der Resonanzbedingungen und damit des SPR-Signals zu erreichen. Die meisten SPR-Sensoren, einschließlich des zuerst beschriebenen SPR-Sensors [Nylander 1982], koppeln Licht über ein Glasprisma zur Anregung der Oberflächenplasmonen ein, während andere Systeme die elektromagnetische Strahlung über ein Gitter [Dostalek 2005] oder einen Wellenleiter [Homola 1995, van Gent 1990] einkoppeln. Ein weiterer optischer Biosensor, der die Anregung von Oberflächenplasmonen nutzt, sind Edelmetall-Nanopartikel, die sich ebenfalls als geeignete Signalwandler für die Biosensorik herausgestellt haben. Ähnlich zur Oberflächenplasmonresonanz bildet hier die Anregung sogenannter Partikelplasmonen (auch lokalisierte Oberflächenplasmonen) und deren Beeinflussung durch Brechungsindexänderungen der lokalen Partikelumgebung das Wirkprinzip dieses Sensors [Haes 2004a, McFarland 2003, Raschke 2003]. Besonders deren Potential für Multiplexing, durch Variation von Partikelgröße, -form und -material sowie die geringe Sensoroberfläche, verbunden mit einem kleinen Probenvolumen, machen diese markierungsfreie Sensorart zu einem vielversprechenden Forschungsziel und werden zusammen mit der SPRS im nachfolgenden Abschnitt detaillierter vorgestellt. In der vorliegenden Arbeit wird dabei besonders das sensorische Potential

von Edelmetall-Nanopartikeln für die DNA-Analytik demonstriert und dabei der kommerziellen Biosensorik auf planaren Goldsubstraten gegenübergestellt.

2.2. Oberflächenplasmonresonanz

2.2.1. Propagierende Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Eine Methode zur Bestimmung der dielektrischen Eigenschaften dünner Filme und Messung von Schichtdicken stellt die Oberflächenresonanzspektroskopie dar. Oberflächenplasmonen wurden erstmals 1957 durch Ritchie [Ritchie 1957] beschrieben, obwohl sie sich bereits durch Theorien von Fresnel und Maxwell aus den Jahren 1821 und 1873 erklären ließen [Maxwell 1873]. Die Anregung der Oberflächenplasmonen wurde erstmalig 1968 von Otto [Otto 1968] durch geschwächte Totalreflexion und durch Kretschmann und Raether [Kretschmann 1968] für Brechungsindexbestimmungen verwendet. Eine neue Klasse von Biosensoren wurde in den frühen 80er Jahren auf Grundlage des SPR-Prinzips entwickelt, die eine markierungsfreie Analyse von biomolekularen Interaktionen in Echtzeit erlauben (*engl. biomolecular interaction analysis*, BIA) [Liedberg 1983]. Die theoretischen Grundlagen der Oberflächenplasmonresonanz (-spektroskopie), sowie deren Verwendung als optischer Biosensor, sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

2.2.1.1. Theoretischen Grundlagen der Oberflächenplasmonresonanz

Trifft parallel polarisiertes Licht unter den Bedingungen der totalen internen Reflexion (*engl. total internal reflection*, TIR) auf ein Prisma, so kann das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz beobachtet werden (Abb. 2.3, links). Die totale interne Reflexion tritt dann auf, wenn der Lichtstrahl auf das Prisma unter einem Einstrahlwinkel Θ trifft, welcher größer als der kritische Winkel Θ_C ist, wodurch das gesamte einfallende Licht reflektiert wird (Abb. 2.3, rechts). Das elektrische Feld der Photonen erstreckt sich dabei etwa eine $\frac{1}{4}$ Wellenlänge in das optisch dünnere Medium (Luft) hinein, obgleich bei der TIR keine Energie transmittiert wird. Dadurch fällt die Intensität des elektromagnetischen Feldes jenseits der Grenzfläche nicht sofort auf null ab. Gleichzeitig läuft eine harmonische Welle parallel zur Oberfläche entlang, während ein Teil auch in das Medium mit kleinerem Brechungsindex eindringt. Die Amplitude der Welle dieses sogenannten evaneszenten Feldes fällt dabei exponentiell ab.

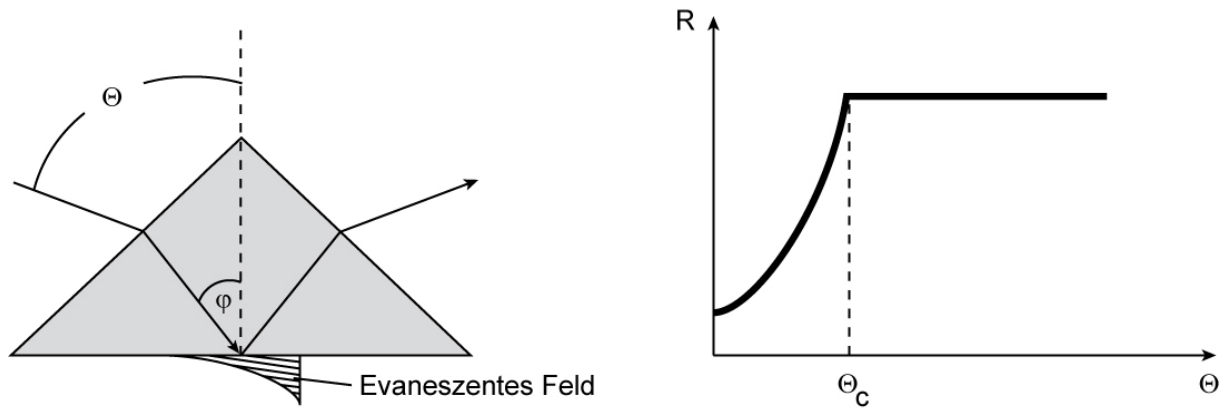


Abbildung 2.3: Links: Schematische Darstellung des Strahlengangs bei der TIR (Totale interne Reflexion) und des sich ausbildenden evaneszenten Feldes. Rechts: Reflektivität in Abhängigkeit vom Einstrahlwinkel.

Bringt man nun einen dünnen Metallfilm (z. B. 50 nm dicker Goldfilm) auf die Unterseite des Prismas auf, so wirkt dieser als teildurchlässiger Spiegel und erhöht dadurch die Reflektivität unterhalb des kritischen Winkels. Oberhalb der Totalreflexionskante kann jedoch das freie Elektronengas des Metallfilms mit dem evaneszenten Feld wechselwirken (Abb. 2.4, links). Trifft der Lichtstrahl unter einem bestimmten Winkel Θ_0 ein, kommt es zu einer resonanten Kopplung der Photonen mit den Elektronen, wodurch diese zu einer Plasmaschwingung angeregt werden. Diese kollektiven Schwingungen der Leitungsbandelektronen entlang der Oberfläche des Metalls werden als Oberflächenplasmonen (*engl. surface plasmon, SP*) und das dazugehörige Quasi-Teilchen als Oberflächenplasmonpolariton (*engl. surface plasmon polariton, SPP*) bezeichnet. Ist die gesamte Energie der Photonen im Metall dissipiert, tritt in der Reflexionskurve unter dem Winkel Θ_0 ein scharfes Minimum auf (Abb. 2.4, rechts).

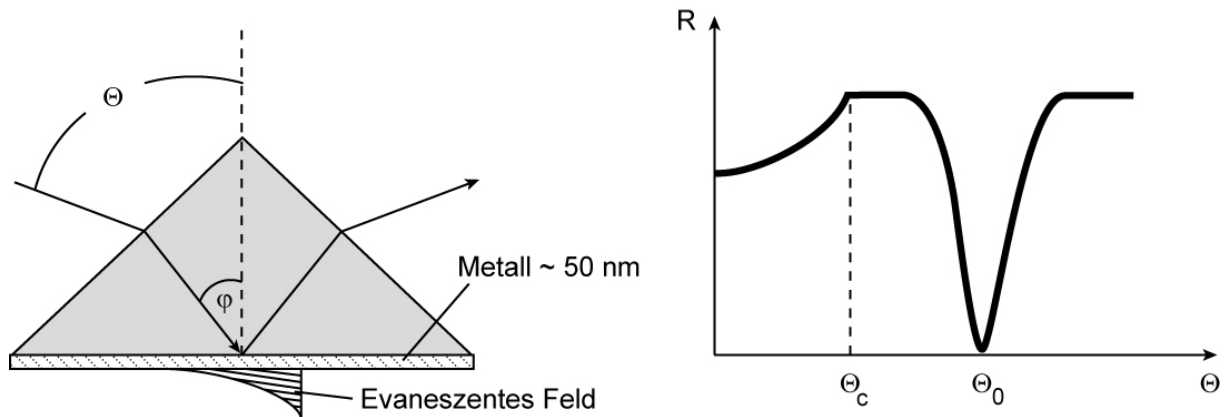


Abbildung 2.4: Links: Anregung von Oberflächenplasmonen in der auf der Prismenunterseite aufgetragenen Metallschicht bei der TIR. Rechts: Reflektivität in Abhängigkeit vom Einstrahlwinkel bei zusätzlicher Anregung von Oberflächenplasmonen.

Durch die Schwingung der Plasmonen wird ebenfalls ein elektromagnetisches Feld erzeugt, welches mit dem evaneszenten Feld vergleichbar ist. Es erstreckt sich nach beiden Seiten der Metall-Glas-Grenzfläche, während die Amplitude exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche abfällt. Die Wellenlänge dieses evaneszenten Feldes entspricht der zur Oberfläche parallelen Komponente des eingestrahlten Lichts. Man unterscheidet bei der Kopplung über ein Prisma zwischen der Otto- und der Kretschmann-Anordnung. Bei erstgenannter wird zwischen dem Metallfilm und dem Prisma ein schmaler Luftspalt gelassen, während sich der Kretschmann-Aufbau (Abb. 2.5) durch einen direkten Kontakt von Metall und Prisma auszeichnet. Allgemein wird bei der Verwendung der Kretschmann-Anordnung entweder Weißlicht parallel, oder monochromatisches Licht unter mehreren Winkeln, zur Bestimmung des Resonanzwinkels eingestrahlt. Einer der heute führenden Vertreter auf dem Gebiet der SPRS ist BIAcore, ein kommerziell erhältliches SPR-System zur biospezifischen Interaktionsanalyse, das 1990 aus einer Initiative

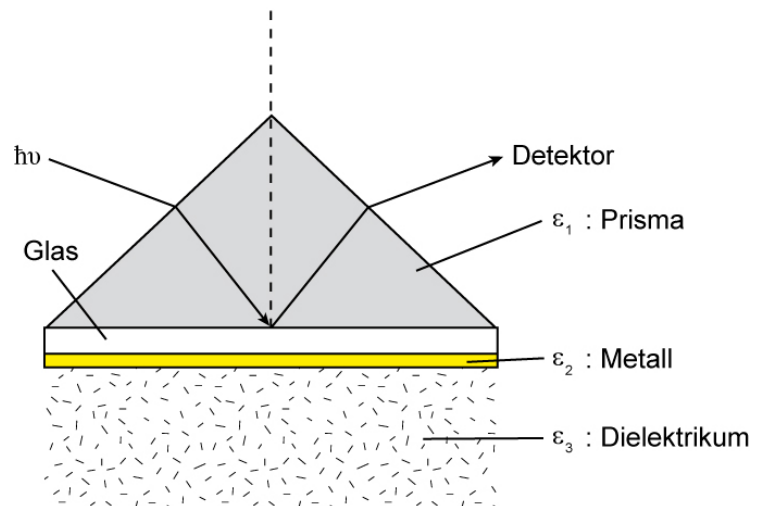


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Kretschmann-Aufbaus zur Detektion von Oberflächenplasmonen.

der schwedische Firma Pharmacia heraus entstanden ist, neue Technologien auf dem Gebiet der Biosensorik zu entwickeln [Liedberg 1995].

2.2.1.2. Messprinzip der SPR-Spektroskopie

Die Resonanzbedingung ergibt sich jeweils durch das Gleichsetzen des Impulses bzw. der Energie des Oberflächenplasmons mit der des angeregten Lichts:

$$\sin \Theta \cdot \sqrt{\epsilon_1(\lambda)} = \sqrt{\frac{\epsilon_{2, \text{re}}(\lambda) \cdot \epsilon_3(\lambda)}{\epsilon_{2, \text{re}}(\lambda) + \epsilon_3(\lambda)}} \quad (1)$$

Die Gleichung zur Bestimmung der Resonanzbedingung zeigt deutlich, dass Brechungsindexänderungen der an den Metallfilm angrenzenden dielektrischen Schicht bei konstantem Einstrahlwinkel Θ zu einer Änderung der Resonanzwellenlänge λ führt. Die SPR-Spektroskopie erlaubt nun eine Echtzeit-Verfolgung von Brechungsindexänderungen, die beispielsweise durch biomolekulare Adsorptionsprozesse hervorgerufen werden. Praktische Anwendungen der SPRS betreffen daher vor allem für die Untersuchung verschiedenster Wechselwirkungssysteme und der Bestimmung ihrer Affinitätsparameter. Dabei kann ein bestimmtes Biomolekül (Rezeptor), welches eine spezifische Interaktion mit einem geeigneten Bindepartner eingehen kann, auf der Sensoroberfläche angebunden werden. Bindet nun ein Analyt, der in einem Fließkanal über die präparierte Oberfläche geleitet wird, unter geeigneten Reaktionsbedingungen (Wahl der Pufferlösung, Temperatur, pH-Wert) an den Sensorchip, so ändern sich die dielektrischen Eigenschaften der Sensorschicht, was in einer Verschiebung der Oberflächenplasmonresonanz resultiert. Die Resonanzänderung wird als Intensitätsänderung in Abhängigkeit vom Einfallswinkel des Lichtstrahls gemessen und kann in einem Sensorgramm, als Resonanzsignal über die Zeit, dargestellt werden (siehe Abbildung 2.6).

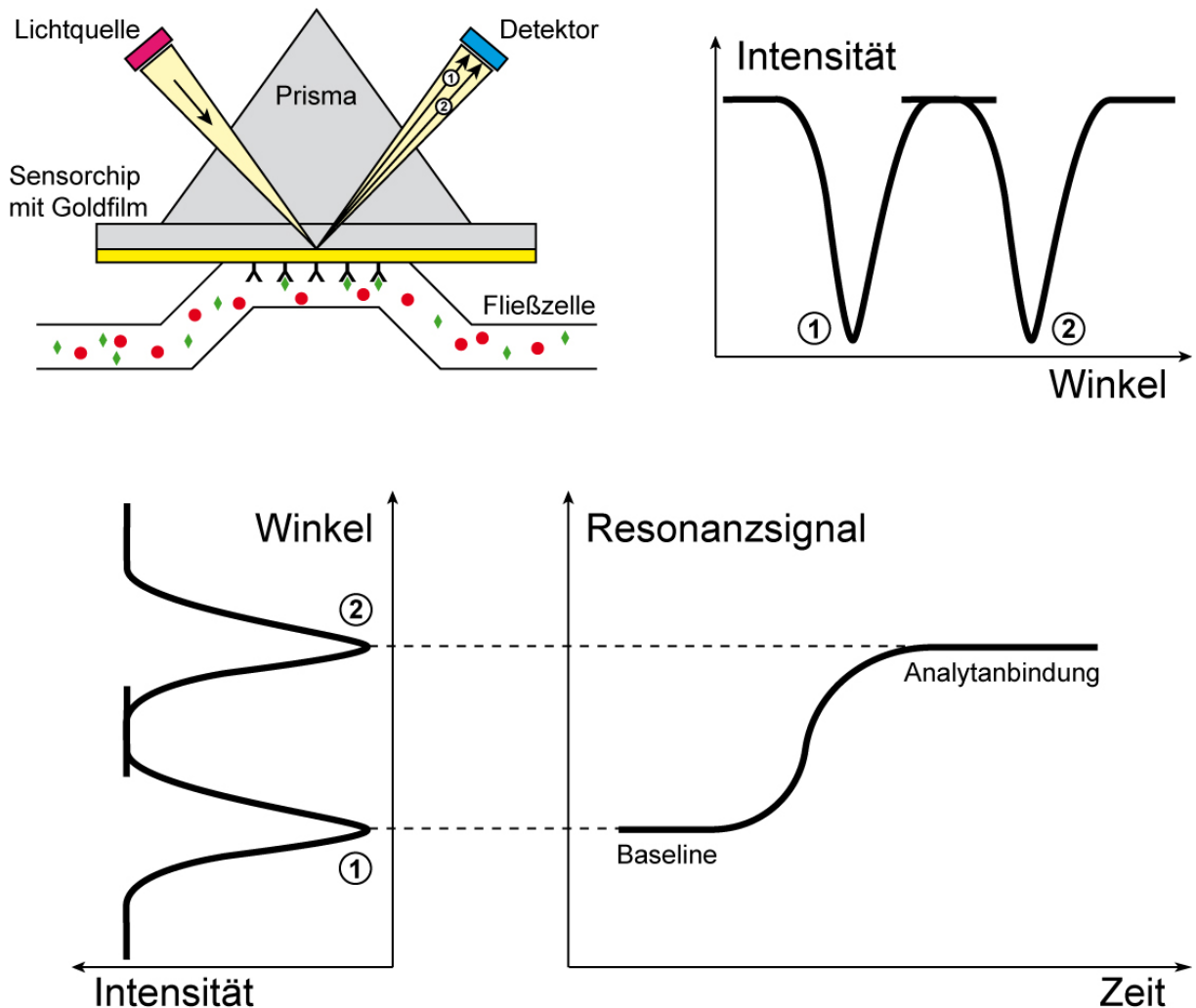


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Detektion biomolekularer Wechselwirkungen mit Hilfe der SPR-Spektroskopie. Das Signal (Winkeländerung) wird in ein Sensorgramm umgerechnet, das die Resonanzänderung über einen bestimmten Zeitraum abbildet.

2.2.1.3. Anwendungsgebiete der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Die SPR-Spektroskopie ermöglicht neben der Detektion von Brechungsindexänderungen der an der Metallschicht angrenzenden Sensorschicht auch eine Echtzeitmessung von Schichtdickenänderungen. Daher betreffen die praktischen Anwendungen der SPRS in der biomedizinischen Diagnostik vor allem die Bestimmung von Affinitätsparametern verschiedener biologischer Interaktionssysteme. Die in der Literatur viel beschriebene Modifizierung von Metall- (Gold-) Oberflächen erlaubt dabei eine Vielzahl an möglichen Erkennungselementen, die je nach biologischer oder chemischer Fragestellung ausgewählt und kovalent auf der Oberfläche des Signalwandlers gebunden werden können. Die wohl am häufigsten genutzten Erkennungselemente sind Antikörper, da sie kommerziell erhältlich sind und über ihre hohe Affini-

tät und Spezifität gegen eine große Zahl an Analytmolekülen eingesetzt werden können [Fägerstam 1990, Karlsson 1991, Mullett 2000]. Eine andere Gruppe von Erkennungselementen stellen Peptide dar, deren Vorteile, neben einer günstigen Herstellung, besonders in ihrer einfachen Manipulierbarkeit und hohen Stabilität liegen. Sie werden hauptsächlich für die Detektion von Antikörpern, wie den Antikörpern gegen Hepatitis G [Rojo 2003], gegen den Epstein-Barr-Virus [Vaisocherova 2007] und dem Herpes-Simplex-Virus [Wittekindt 2000], eingesetzt. Auch der Nachweis bestimmter Schwermetalle ist mit Peptiden möglich [Forzani 2004]. Zuletzt haben sich auch Aptamere als vielversprechende Typen der biomolekularen Erkennungselemente hervorgetan [Wang 2007, Win 2006]. Aptamere (DNA- oder RNA-) sind einzelsträngige Oligonukleotidsequenzen, die eine Vielzahl von Molekülen wie Proteine, Nukleinsäuren, kleinere Moleküle, aber auch Zellen, Gewebe und Organismen erkennen können [Jayasena 1999, Wang 2007].

Anwendungsgebiet	Analyt	Referenz
Qualität/Sicherheit von Lebensmitteln	Pathogene	[Fratamico 1998]
	Toxine	[Nedelkov 2000]
	Vitamine	[Caelen 2003]
	Hormone	[Gillis 2002]
	chem. Verunreinigungen	[Kim 2006]
	Allergene	[Mohammed 2001]
Medizinische Diagnostik	Tumormarker	[Healy 2007]
	Allergiemarker	[Vaisocherova 2007]
	Schlaganfallmarker	[Wei 2003]
	Hormone	[Ladd 2004]
Umweltkontrolle	Pestizide	[Farré 2007]
	Phenole	[Soh 2003]
	Schwermetalle	[Ock 2001]

Tabelle 2.3: Anwendungsgebiete und Beispiele für detektierte Analyten durch die SPR-Spektroskopie.

2.2.1.4. Vor- und Nachteile konventioneller SPR-Spektroskopie

Die Vorteile der SPR-Spektroskopie liegen im Vergleich zu anderen Methoden besonders in der markierungsfreien Echtzeitdetektion biomolekularer Wechselwirkungen bei einer hohen

Sensitivität. Gerade die recht aufwendige, chemische Markierung der zu untersuchenden Analyten ist hier nicht erforderlich. Die auf SPR-basierenden Bio- und Chemosensoren zeigen Sensitivitäten in einer Größenordnung von ca. $2 \cdot 10^6$ nm/RIU (RIU = *refractive index unit*), was einer Molekülmasse von $1 \cdot 10^{-1}$ pg/mm² auf der Oberfläche entspricht [Haes 2004b, Jung 1998]. Besonders für die Bestimmung von Schichtdicken ist die relativ große Abschwächungslänge von 200-300 nm vorteilhaft, da in einem weiten Bereich bis etwa 200 nm eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen der Dicke der adsorbierten Schicht und der Sensorantwort angenommen werden. Außerdem erlaubt die Echtzeitmessung eine genaue Ermittlung von Kinetik-Konstanten der untersuchten biochemischen Interaktion in einem Zeitbereich von 10^{-1} bis 10^3 Sekunden. Ein weiterer Vorteil ist die Wahl zwischen verschiedenen Betriebsmodi für die Durchführung der Messung. So kann entweder die Änderung des Resonanzwinkels als auch die der Resonanzwellenlänge durch das SPR-Spektrometer detektiert werden [Jung 1998]. Eine Miniaturisierung dieser Methode wird durch eine laterale Auflösung von lediglich 10 µm (entspricht der Ausbreitungslänge der Oberflächenplasmonen) begünstigt [Haes 2003, Haes 2004a, Haes 2004b]. Eine als SPR-Imaging bekannte Erweiterung der konventionellen SPRS, die in einem Array-Format durchgeführt wird, stellt die Auswertung der biomolekularen Wechselwirkung in Form eines farbigen Bildes dar [Steiner 2002]. Nicht zuletzt ist der große Umfang an kommerzieller Verfügbarkeit von SPR-Messsystemen ein weiterer positiver Aspekt dieser Technologie.

Nachteile finden sich vor allem in den hohen Anschaffungskosten der SPR-Spektrometer, die durchaus im fünfstelligen Euro-Bereich zu finden sind. Zudem sind viele Geräte besonders durch ihre Größe nicht für jedes Forschungslabor geschaffen. Die hohe Sensitivität der SPR-Geräte erfordert außerdem ein Arbeiten bei definierter Temperatur, wodurch die SPR-Sensoren immer eine integrierte Vorrichtung zur Temperaturkontrolle benötigen [Haes 2003, Haes 2004a, Haes 2004b]. Weiterhin ist der große technische Aufwand für ein Hochdurchsatz-Verfahren beispielsweise für die Applikation zur Wirkstoffsuche als Nachteil dieser Methode anzurechnen [Steiner 2002].

Eine andere Art optischer Biosensoren wurde mit der Anregung lokalisierter Oberflächenplasmonen in Edelmetall-Nanopartikeln im vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnt. Durch ihre kleine Sensoroberfläche und die geringe Temperatursensibilität haben sie großes Potential, bei vergleichbaren Vorteilen mit der SPRS zu konkurrieren bzw. diese als bevorzugte Sensorart zu verdrängen. Im folgenden Abschnitt wird das Grundprinzip der LSPR-Sensorik sowie deren Potential für die Biosensorik vorgestellt.

2.2.2. Lokalisierte Oberflächenplasmonresonanz (LSPR)

Viele bekannte Forscher, wie beispielsweise der Physiker Faraday [Faraday 1857], haben sich intensiv mit der Untersuchung der optischen Eigenschaften kolloidaler Nanopartikel beschäftigt. Auffälligstes Merkmal beispielsweise von Gold-Kolloiden ist deren rote Farbe, dem der typische, metallisch gelbe Glanz von massivem Gold gegenüber steht. Grund hierfür ist, dass Goldnanopartikel (im Gegensatz zu makroskopischem Gold) eine starke Absorptionsbande im sichtbaren Wellenlängenbereich aufweisen. Diese Bande tritt auf, wenn die Photonenfrequenz der eingestrahlten, elektromagnetischen Strahlung geeignet ist, um die Leitungsbandelektroden der Nanopartikel in eine kollektive Schwingung zu versetzen. Das der kollektiven Schwingung zugeordnete Quasi-Teilchen wird als Partikel-Plasmon oder auch als lokalisiertes Oberflächenplasmon (*engl. localized surface plasmon resonance*, LSPR) bezeichnet. Die Lage (maximaler Peak des Spektrums im sichtbaren Wellenlängenbereich) dieser lokalisierten Oberflächenplasmonresonanz hängt dabei von Faktoren wie Partikelgröße, -form, -material sowie der Materialzusammensetzung ab. Auch der Brechungsindex des den Nanopartikel umgebenden Mediums hat einen Einfluss auf die LSPR. Im folgenden Kapitel soll detaillierter auf die optischen Eigenschaften der Nanopartikel eingegangen werden. Die theoretischen Betrachtungen sind dabei hauptsächlich [Mie 1908], [Kreibig 1995], [Mulvaney 1996] und [Bohren 2007] entnommen, sofern keine zusätzliche Angaben gemacht werden.

2.2.2.1. Partikelplasmonen (lokalisierte Oberflächenplasmonen)

Anhand der schematischen Darstellung zur Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit einem Goldnanopartikel in Abbildung 2.7 können viele der optischen Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln verstanden werden. Im sichtbaren Wellenlängenbereich liegt die Eindringtiefe einer elektromagnetischen Welle in der gleichen Größenordnung wie der Partikeldurchmesser. Dadurch kann die Welle das Partikel nahezu komplett durchdringen, wobei das elektrische Feld die freien Ladungsträger des Metalls relativ zu den positiven Ionenrümpfen kollektiv auslenkt. Durch die Coulomb-Anziehung zwischen entgegengesetzten Ladungen entsteht dabei eine Rückstellkraft in dem oszillierenden System, bei dem die Leitungsbandelektroden mit der Frequenz des anregenden Lichts schwingen. Das dazugehörige Quasi-Teilchen wird auch als Partikel- oder lokalisiertes Oberflächenplasmon bezeichnet. Verbunden mit der Dipolschwingung ist wiederum ein elektromagnetisches Feld, das sich unter anderem als Streulicht beobachten lässt. Durch Strahlungszerrfall wird ein Teil der anregenden Energie dissipiert, wobei die Intensität des Streulichts von der natürlichen Frequenz

des Oszillators abhängt. Somit zeigen viele Nanopartikel ausgeprägte Resonanzen sowohl im Streu- als auch im Absorptionsspektrum. Bei Gold- und Silbernanopartikeln liegen die Resonanzen hauptsächlich im sichtbaren Wellenlängenbereich, weshalb sie interessante Objekte für Untersuchungen zu optischen Eigenschaften von Nanopartikeln darstellen, da die Anregung der Partikelplasmonen mit einer einfachen Halogenlichtquelle realisiert werden kann.

Die Lage des Resonanzspektrums hängt zum einen von intrinsischen Faktoren des verwendeten Nanopartikels ab. Besonders die Größe und Form des Partikels, aber auch das verwendete Material sowie die Zusammensetzung des Materials (Kern-Hülle-Partikel oder Alloy-Partikel aus mindestens zwei verschiedenen Materialien) haben einen großen Einfluss auf die exakte spektrale Resonanzlage. Zum anderen können extrinsische Faktoren wie umgebende Medium und auf der Partikeloberfläche gebundene Moleküle das Resonanzspektrum beeinflussen. Dass die Lage der Plasmonresonanz auch von der Polarisierbarkeit des partikelumgebenden Mediums abhängt, wird bereits anhand der in Abbildung 2.7 skizzierten Feldlinien verdeutlicht.

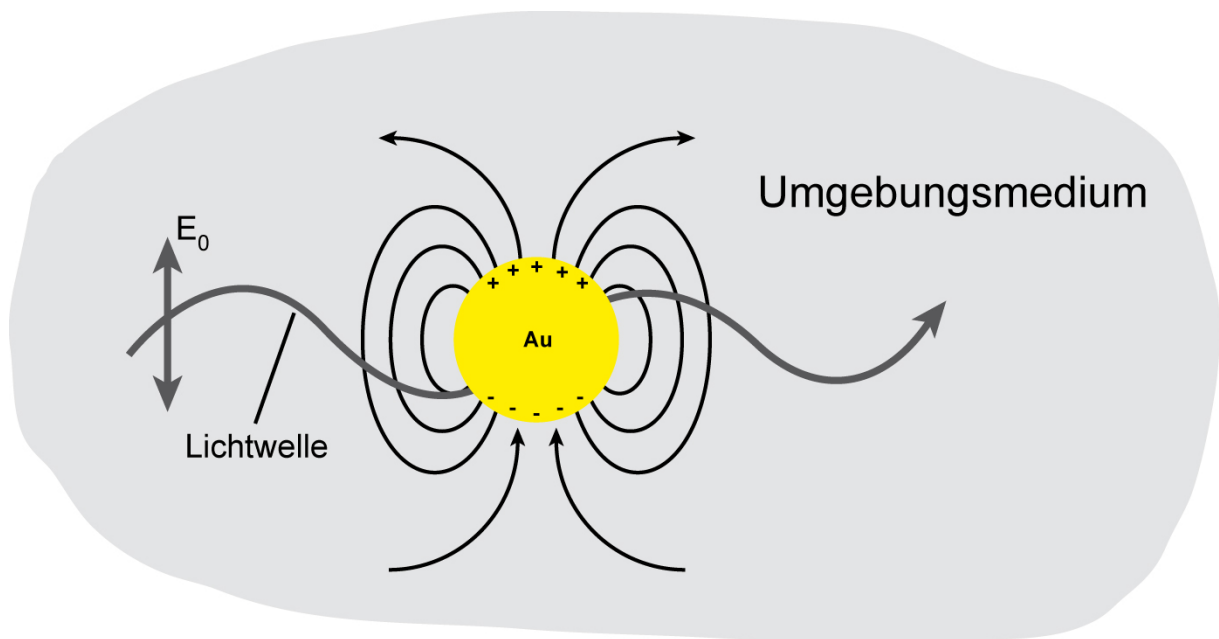


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Entstehung von lokalisierten Oberflächenplasmonen. Eine auf das Goldpartikel einfallende elektromagnetische Welle durchdringt das Nanoteilchen vollständig und regt die Leitungselektronen des Metalls zur kollektiven Oszillation an (nach [Hutter 2004]).

Nachfolgend werden die vorher beschriebenen optischen Eigenschaften von lokalisierten Oberflächenplasmonen genauer dargestellt und mit der Mie-Theorie eine Methodik vorgestellt

werden, mit deren Hilfe sich die Resonanzspektren von Nanopartikeln, sowie die Auswirkung extrinsischer Einflüsse, exakt berechnen lassen.

2.2.2.2. Dielektrische Eigenschaften von Nanopartikeln

Über die Funktion $\varepsilon = \varepsilon' + i\varepsilon''$ wird die Antwort eines Metalls auf ein externes elektrisches Feld beschrieben, wobei der Realteil ε' die Polarisation des Materials durch das elektrische Feld darstellt. Der Imaginärteil $i\varepsilon''$ dieser Funktion drückt die Absorption und Phase der Antwort bezüglich des externen Feldes aus, wozu alle intrinsischen Dämpfungsmechanismen, wie z. B. die Elektronenstreuung, einen Beitrag dazu leisten. Die dielektrische Funktion wird im Falle dessen, dass die Frequenz des elektrischen Feldes im optischen Bereich liegt, durch die elektrische Suszeptibilität ersetzt:

$$\varepsilon(\omega) = 1 + \chi_D(\omega) + \chi_B(\omega) \quad (2)$$

Der komplexe Beitrag der quasi-freien Leitungsbandelektronen wird durch χ_D wiedergegeben, während der komplexe Anteil der gebundenen Rumpfelektronen in energetisch tiefer liegenden Bänder des Metalls durch χ_B dargestellt ist. Im sichtbaren Wellenlängenbereich hängt der Realteil von $\chi_B(\chi_{B,Re})$ nur in geringem Maße von der Frequenz ab und wird daher als konstant angenommen. In der vorangegangenen Gleichung kann nun $1 + \chi_{B,Re} = \text{konstant} = \varepsilon_\infty$ ersetzt werden:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \chi_D(\omega) + i\chi_{B,Im}(\omega) \quad (3)$$

Mie-Theorie

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschäftigte sich Gustav Mie intensiv mit den optischen Eigenschaften kolloidaler Partikellösungen und veröffentlichte eine vielfach zitierte Arbeit zur Lichtstreuung von Edelmetall-Nanopartikeln [Mie 1908]. Die darin beschriebene Theorie nimmt Bezug auf Absorption und Streuung von Licht an einem einzelnen sphärischen Metallteilchen, mit der sich sowohl die Absorptions- und Streuquerschnitte als auch die Verteilung des elektromagnetischen Feldes in und um den Nanopartikel analytisch berechnen lassen. Für Nanopartikel mit einem Durchmesser, der in der Größenordnung der Wellenlänge des einfallenden Lichts liegt, setzt sich die Extinktion bei einer vorgegebenen Wellenlänge aus der Absorption und Streuung zusammen. Damit gilt für den Extinktionsquerschnitt C_{Ext} die Formel:

$$C_{Ext} = C_{Abs} + C_{Str} \quad (4)$$

Die Extinktion eines einzelnen Metallteilchens kann über die Lösung der in sphärische Koordinaten transformierten Maxwell-Gleichungen berechnet werden. Dabei wird das Metallkolloid als Koordinatenursprung angenommen und die Gleichung für eine monochromatische, aus dem Unendlichen auf das Partikel einfallende, ebene Welle gelöst. Als Parameter gehen dazu lediglich die dielektrischen Funktionen von Partikel und Umgebung sowie der Partikelradius in die Gleichung ein. Die elektromagnetischen Felder außerhalb und innerhalb des Partikels werden als sogenannten Multipole (Kugelflächenfunktionen) entwickelt. Es treten dabei vier Entwicklungskoeffizienten a_L , b_L , c_L und d_L (mit L als Multipol-Ordnung) auf, wobei der Einfachheit halber nur die beiden Koeffizienten für das Feld außerhalb des Partikels, a_L und b_L , betrachtet werden sollen:

$$a_L = \frac{m \psi_L(mx) \psi'_L(x) - \psi_L(x) \psi'_L(mx)}{m \psi_L(mx) \xi'_L(x) - \xi_L(x) \psi'_L(mx)} \quad (5)$$

$$b_L = \frac{\psi_L(mx) \psi'_L(x) - m \psi_L(x) \psi'_L(mx)}{\psi_L(mx) \xi'_L(x) - m \xi_L(x) \psi'_L(mx)} \quad (6)$$

Das Verhältnis der dielektrischen Funktionen von Partikel und Umgebungsmedium ist durch $m = n_{Partikel} / n_{Medium}$ gegeben, während der Größenparameter $x = 2\pi R/\lambda$ das Verhältnis von Partikelradius R und der Wellenlänge λ beschreibt. $\psi_L(z)$ und $\xi_L(z)$ sind Ricatti-Bessel-Funktionen sowie deren Ableitungen $\psi'_L(z)$ und $\xi'_L(z)$ [Bohren 2007]. Die sich daraus ergebenden Gleichungen lassen sich numerisch lösen und erlauben dadurch eine exakte Bestimmung der Extinktions- und Streuquerschnitte:

$$C_{Ext}(\lambda) = \frac{\lambda^2}{2\pi\epsilon_m} \sum_{L=1}^{\infty} (-1)^L \text{Im}(a_L - b_L) \quad (7)$$

$$C_{Str}(\lambda) = \frac{\lambda^2}{2\pi\epsilon_m} \sum_{L=1}^{\infty} \frac{|a_L|^2 - |b_L|^2}{2L+1} \quad (8)$$

Da die Dielektrizitätskonstante ε_m hier als wellenlängenunabhängig angenommen wird, werden die optischen Eigenschaften eines Metallkolloids durch seine Größe R und der dielektrischen Eigenschaften des umgebenden Mediums η_m bestimmt.

Um die im folgenden Abschnitt dargestellten Resonanzverschiebungen durch molekulare Bindeereignisse auf metallischen Nanopartikeln theoretisch vorhersagen zu können, wurde auf eine Erweiterung der *Mie-Theorie für Schalen-Partikel* zurückgegriffen. Das Matlab-Skript mit den Einzelheiten zur Berechnung ist in Anhang B/C dargestellt. Über den Brechungsindex sowie der theoretischen Schichtdicke der auf der Partikeloberfläche gebundenen Biomoleküle lässt sich dadurch die zu erwartende Änderung des LSPR-Signals berechnen.

2.2.2.3. Resonanzverschiebung durch molekulare Bindeereignisse

Aus der Sensitivität der LSPR gegenüber Brechungsindexänderungen im Umgebungsmedium heraus entstand die Idee, Edelmetall-Nanopartikel (analog zur konventionellen SPRS) für die biosensorische Anwendung nutzbar zu machen. Dabei dient der Nanopartikel als optischer Signalwandler, der eine Änderung der dielektrischen Eigenschaften seiner Umgebung als messbare Verschiebung der Plasmonresonanz umsetzt. Durch die Anbindung von Biomolekülen wird lokal der Brechungsindex des Umgebungsmediums verändert, wodurch sich die Resonanzposition zu höheren Wellenlängen verschiebt. Die resultierende Resonanzänderung ist das, in diesem Fall, biosensorisch interessante Signal. Der prinzipielle Ablauf einer solchen Anwendung wird nachfolgend erläutert und ist schematisch in Abbildung 2.8 dargestellt.

Zunächst muss das Nanopartikel mit einem Molekül funktionalisiert werden, welches zum einen auf der Oberfläche des Nanoteilchens angebunden werden kann und zum anderen spezifisch Analytmoleküle erkennen und binden kann. Dadurch entsteht um den Nanopartikel eine Hülle aus spezifischen Erkennungselementen, deren Dicke von den verwendeten Molekülen abhängt. Der Brechungsindex in der unmittelbaren Umgebung um den Nanopartikel wird durch diese biologische Schicht verändert, wobei die Werte einer organischen Schicht typischerweise bei $n_{\text{Bio}} = 1,50$ liegen (siehe auch Kapitel 4.3.1). Dabei hat die Bedeckungsdichte einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf den lokalen Brechungsindex – ist die Partikeloberfläche nur zur Hälfte mit Erkennungselementen bedeckt, so liegt der resultierende Brechungsindex der organischen Schicht nur noch bei $n = 1,25$ (mit $n = (n_{\text{Bio}} + n_{\text{Med}})/2$). Bei Zugabe eines geeigneten Analyten bindet dieser an die vorher funktionalisierten Nanopartikel, wodurch sich der Durchmesser der organischen Schicht abermals vergrößert. Der lokale Brechungsindex um den Nanopartikel ändert sich erneut und resultiert auch hier in einer weiteren

Änderung der Resonanzposition. Die erfolgreiche Interaktion zwischen dem Analyten und der Erkennungsschicht lässt sich aus der Verschiebung der Plasmonresonanz ableiten.

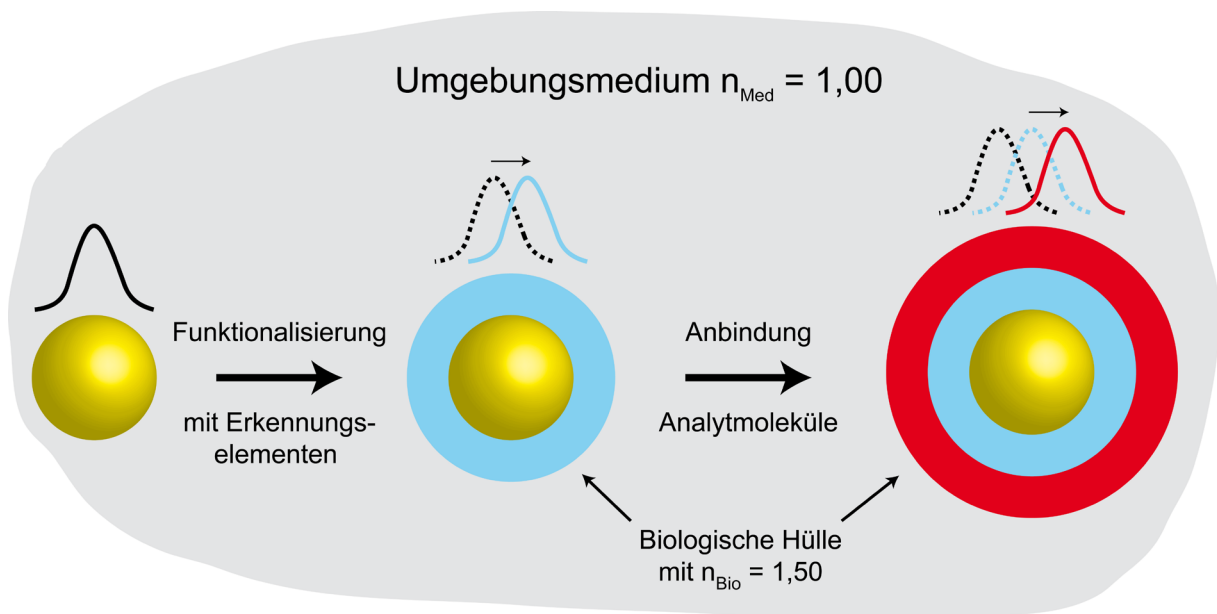


Abbildung 2.8: Funktionsprinzip eines Einzelpartikel-Biosensors. Bei der Funktionalisierung bildet sich um den Partikel eine Schicht mit Erkennungselementen (blau), die fest an die Partikeloberfläche gebunden sind. Die spezifische Anbindung von geeigneten Analytmolekülen an die funktionalisierten Nanoteilchen resultiert in einer Vergrößerung der biologischen Hülle (rot). Die aus dem letzten Schritt folgende Verschiebung der Plasmonresonanz ist der Ausgangspunkt für die biosensorische Applikation dieser Sensorart.

Eine Messung nach diesem Sensorprinzip lässt sich auf verschiedene Arten bewerkstelligen. Einerseits kann die Plasmonresonanz durch herkömmliche Absorptionsspektroskopie einer wässrigen Lösung funktionalisierter Nanopartikel vor und nach der Anbindung von Analytmolekülen gemessen werden [Englebienne 1998, Englebienne 2001]. Alternativ dazu lässt sich auch die Extinktion einer Monolage von Partikeln ermitteln, die zuvor auf einem Glasobjektträger immobilisiert wurden [Haes 2002]. Beide Ansätze, die Ensemble-Messung in Lösung als auch die Messung von Partikel-Monolagen, benötigen eine hohe Konzentration der Analytmoleküle, da die Sensorfläche aller gemessenen Partikel in das Signal eingeht. Eine drastische Reduktion an benötigten Analytmolekülen (und damit eine deutliche Sensitivitätserhöhung) erhält man daher durch die Verwendung eines *einzelnen* Nanopartikels als Transducer. Eben dieser Ansatz soll in den weiteren Untersuchungen verfolgt werden.

In den nachfolgenden Abschnitten wird ein Überblick über den bisherigen Stand der Wissenschaft auf dem Gebiet der LSPR-Sensorik für Ensemble-Messungen als auch für die Einzelpartikelsensorik gegeben. Neben den potentiellen Anwendungen wird dabei auch auf die Sensitivität der jeweiligen Systeme eingegangen.

2.2.2.4. LSPR-Sensorik an Partikel-Ensembles

LSPR Sensorik in Lösung

Der Nachweis biomolekularer Interaktionen über LSPR-Messungen von Partikellösungen kann auf der Sensitivität der Resonanzposition auf einen durch Interaktionen veränderten Partikelabstand basieren. Dabei treten über Dipol-Dipol-Kopplungen vermittelte elektromagnetische Wechselwirkungen zwischen den Partikeln auf, wenn der Abstand zwischen ihnen geringer als der Partikeldurchmesser wird [Englebienne 2003, Haes 2003, Haes 2004a, Haes 2004b, Liedberg 1993, Lukosz 1991, Lukosz 1997]. Über spektroskopische Methoden ist die resultierende Verbreiterung und Verschiebung der Plasmonresonanz zu höheren Wellenlängen detektierbar. So finden sich in der Literatur vermehrt Anwendungen, um einen mit Nanopartikeln markierten DNA-Einzelstrang über Hybridisierung mit dem ebenfalls markierten, komplementären DNA-Strang nachzuweisen [Elghanian 1997, Mirkin 1996, Rosi 2005, Storhoff 2000]. Detektionsgrenzen für den DNA-Nachweis im unteren fmol/l-Bereich liegen damit bereits zwei Größenordnungen unter der Detektionsgrenze mittels Fluoreszenzmarkierung. Auch der spezifische Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen über eine Nanopartikel-Markierung in Lösung wurde bereits beschrieben [Niemeyer 2001, Rosi 2005]. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt in der einfachen Detektion des Farbumschlages, der selbst für Volumen unter 1 ml mit dem bloßen Auge erkannt wird.

Zur Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen kann aber auch die oben beschriebene lokale Brechungsindexänderung des partikelumgebenden Mediums herangezogen und die daraus folgende Resonanzverschiebung aufgrund von Bindeprozessen auf der Partikeloberfläche genutzt werden [Haes 2002]. Die spezifische Detektion von Antigenen aus dem Blutplasma konnte so bereits über mit Immunglobulinen funktionalisierte Kern-Hülle-Partikel (Silizium-Kern mit Gold-Hülle) demonstriert werden [Hirsch 2003]. Auch konnten Nanopartikel genutzt werden, um eine induzierte Konformationsänderung der auf ihnen gebundenen Proteine zu untersuchen. Die Dichteänderung der Proteinschicht auf den Nanoteilchen bewirkte hier die Verschiebung der detektierten Plasmonresonanz [Englebienne 2003].

Neuere Arbeiten auf diesem Gebiet beschäftigten sich mit der Untersuchung zur Erhöhung der Sensitivität von Nanopartikeln durch den Einsatz verschiedener Partikelgrößen, -formen und -materialien. Hier zeigten besonders anisotrope Partikel [Beeram 2009, Joshi 2012], Silberdreiecke [Yonzon 2005], sphärische Silberpartikel [Fan 2010] und sphärische Goldpartikel mit dünner Silberhülle (2-4 nm) eine hohe Verschiebung der Plasmonresonanz [Steinbrück 2011].

LSPR-Sensorik auf Trägersystemen

Einen neuartigen Weg zur Erzeugung von LSPR-aktiven Sensorschichten bietet die Anbindung von Edelmetall-Nanopartikeln auf festen Trägersystemen, die analog zur SPR-Spektroskopie für den markierungsfreien Nachweis molekularer Bindeereignisse genutzt werden können. Auch hier wird die Sensitivität der Resonanzposition gegenüber Brechungsindexänderungen infolge der Anbindung von Molekülen auf der Oberfläche bedingt [Haes 2002, Riboh 2003]. Der Vorteil dieser Methode, gegenüber dem zuvor beschriebenen Detektionsprinzip, ist die genaue Positionierung der LSPR-Sensorschicht für einen trägerbasierten Ansatz, wodurch die Integration dieser Sensorart in Biochips realisiert werden kann.

Eine Methode zur Herstellung von Nanopartikel-Arrays wurde durch die Einführung der sogenannten „Nanosphere Lithography“ (NSL) ermöglicht, wodurch sehr definierte Nanostrukturen hochgeordnet auf ein Substrat gebracht werden können [Haynes 2001]. Mit Hilfe von NSL-strukturierten Silberprismen konnten verschiedene biologische Fragestellungen, wie die Detektion von Biomarkern in synthetischen und klinischen Proben von Alzheimer-Patienten [Haes 2005] oder auch der Interaktion von Concanavalin mit bestimmten Monosacchariden [Yonzon 2005], untersucht werden.

Ein Verfahren zur simultanen Detektion an Goldnanopartikeln in Stäbchenform mit unterschiedlichem Aspekt-Verhältnis konnte über UV-Vis-Spektroskopie demonstriert werden. Dabei wurde die Erhöhung der Sensitivität gegenüber biomolekularen Interaktionen auf der Oberfläche dieser Nanostäbchen gezeigt [Huang 2011]. Andere Partikelarten wie Kern-Hülle-Partikel (Silizium-Kern, Goldhülle) wurden beispielsweise für die Untersuchung von biologischen Interaktionen verwendet [Endo 2005]. Auch konnte deren Verwendung für einen Antigen-Antikörper-Nachweis auf einem Chipsubstrat gezeigt werden [Endo 2006]. Ein ähnlicher Ansatz kam bei der Untersuchung eines Aptamer-Antigen-Antikörper-Sandwich-Komplexes zum Einsatz [Guo 2011].

2.2.2.5. Einzelpartikelsensorik

Viele Beispiele von Messungen der Streuspektren einzelner Nanopartikel wurden bereits detailliert in der Literatur beschrieben [Mock 2002, Sherry 2005, Sherry 2006, Sönnichsen 2000, Sönnichsen 2002]. Die Plasmonresonanzen einzelner Nanostäbchen und Nanokugeln aus Gold wurden dabei von Sönnichsen untersucht. Durchlicht-Dunkelfeld-Spektroskopie wurde zur Messung der plasmonresonanten Linienbreiten dieser chemisch synthetisierten Nanopartikel herangezogen. Dabei wurde die Strahlungszerrfall-Rate untersucht mit dem Ergebnis, dass die Linienbreiten der vermessenen Nanopartikel sehr schmal sind (um die 37 nm) [Sönnichsen 2002].

Eine ebenfalls 2002 publizierte Arbeit beschäftigte sich daher erstmals mit der systematischen Untersuchung von Größen- und Formeffekten individueller Nanopartikel auf die Lage und Intensität ihres Streuspektrums. Über eine korrelative Analyse mit Hilfe von Dunkelfeld-Mikroskopie, Streuspektroskopie und TEM wurden dabei die Beziehungen zwischen den geometrischen und den optischen Eigenschaften plasmonresonanter Silberpartikel bestimmt. Neben einer Rotverschiebung der Resonanzposition bei steigendem Partikeldurchmesser konnte auch der Einfluss einer Wärmebehandlung auf die Partikelgeometrie mit einhergehender Änderung der Resonanzlage demonstriert werden [Mock 2002]. Die gleiche Gruppe beschäftigte sich auch mit der Brechungsindex-abhängigen Änderung der Resonanzlage an derartigen Silberpartikeln. Hierfür wurde der lokale Brechungsindex des Partikelumgebenden Mediums durch Zugabe von Immersionsölen mit definiertem Brechungsindex verändert. Die nachfolgend ermittelten Streuspektren zeigten dabei eine lineare Abhängigkeit sowie eine hohe Sensitivität gegenüber den lokalen Brechungsindexänderungen. Erstmals wurde hier eine mögliche Verwendung dieser Nanostrukturen für die Biosensorik diskutiert [Mock 2003].

Erstmals wurde im Jahr 2003 über eine biosensorische Applikation an einem einzelnen Nanopartikel berichtet. Dabei wurde ein Goldnanopartikel mit biotinyliertem Rinderserumalbumin (*engl. bovine serum albumin*, BSA) funktionalisiert. Anschließend konnte über die Messung der Resonanzänderung des Goldnanopartikels die Anbindung von Streptavidin an das Biotin demonstriert werden [Raschke 2003]. Verschiedene biologische Fragestellungen wurden über die Biotin-Streptavidin-Bindung untersucht [Baciu 2008, Nusz 2008, Sönnichsen 2005]. Untersuchungen zu Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen, als auch Studien über die reversible Anbindung von Antikörpern, wurden bereits beschrieben [Cao 2009, Mayer 2010]. Ein ebenfalls für die Bioanalytik interessanter Ansatz ist die Verwendung von DNA-

Aptameren [Hernandez 2009]. Oxidationsprozesse, wie die der Ascorbinsäure, lassen sich ebenfalls über die Einzelpartikelspektroskopie auflösen [Novo 2008]. Auch der Nachweis von Tumormarkern konnte durch die Verwendung von individuellen Goldnanopartikeln als Biosensor gezeigt werden [Hwang 2011].

Im Bereich der Einzelpartikelsensorik finden sich in der Literatur die unterschiedlichsten Arten von Biosensoren. Neben den oben erwähnten Silberprismen finden sich auch andere Nanoteilchen wie Goldstäbchen [Baciu 2008], Silberwürfel [Sherry 2005], Goldbipyramiden [Mayer 2010], Goldkugeln [Sannomiya 2008], Gold-„Nanoshells“ [Nehl 2004] sowie sternförmige Goldpartikel [Nehl 2006] wieder.

Die Verwendung von DNA in der Einzelpartikelsensorik wurde für deren Nutzung zur Abstandsbestimmung von zwei sphärischen Nanopartikel (aus Gold und /oder Silber) [Sönichsen 2005] sowie als reines Spacermolekül zwischen einzelnen Nanopartikeln demonstriert [Sannomiya 2008]. Eine systematische Studie zur DNA-Analytik mit Hilfe der Einzelpartikelsensorik ist Gegenstand dieser Arbeit und bietet großes Potential für die Bioanalytik. Eine detaillierte Analyse zur Hybridisierung von DNA-Molekülen auf individuellen Nanopartikeln war bisher nicht Gegenstand der Forschung. Aufgrund der Vorteile der Nanopartikel hinsichtlich ihrer geringen Größe soll deren Potential für die DNA-Analytik in dieser Arbeit untersucht werden. Dazu soll neben der Hybridisierung von Analyt-DNA auch die Funktionalisierung der Nanopartikel mit Fänger-DNA überprüft werden, da hier die Effizienz der nachfolgenden Hybridisierungsreaktion festgelegt wird. Eine DNA-Sandwich-System und ein spezifischer DNA-Nachweis von Pflanzenpathogenen soll anschließend die Anwendbarkeit der vorgestellten Methode belegen. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse mit denen der SPR-Spektroskopie soll zudem die Einzelpartikelsensorik mit einem kommerziell angewandten Biosensor-System vergleichen.

2.3. Zielstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das sensorische Potential von Edelmetall-Nanopartikeln für die Bioanalytik gezeigt werden. Die Einzelpartikelspektroskopie soll dabei als optisches Messverfahren dienen, um die durch biomolekulare Wechselwirkungen bedingten Brechungsindexänderungen der lokalen Nanopartikel-Umgebung detektieren zu können. Die Grenzen der Einzelpartikelspektroskopie, besonders bei der Verwendung dieser Nanosensoren im Bereich der DNA-Analytik, sollen dabei detaillierter untersucht und das Potential dieser Methode auch für andere bioanalytische Fragestellungen demonstriert werden. Neben der Bestimmung der Detektionsgrenzen von Hybridisierungsereignissen auf individuellen Nanopartikeln soll auch eine Methode zur Signalverstärkung vorgestellt werden. Mit Hilfe von Kalkulationen zu Bindeereignissen nach der Mie-Theorie sollen über die ermittelten Ergebnisse Aussagen zur Anbindungseffizienz der Analytmoleküle und Bedeckungsdichte von Biomolekülen auf der Partikeloberfläche getroffen werden. Mit der Verwendung eines DNA-Sandwich-Systems beabsichtigt dabei, das applikative Potential des Einzelpartikelsensors zu prüfen. Außerdem soll die Abhängigkeit des LSPR-Signals in Bezug auf die Masse der angeordneten Biomoleküle und deren Abstand von der Sensoroberfläche untersucht und untereinander verglichen werden. Ein konkretes Anwendungsbeispiel soll die Bestimmung des Pflanzenschädlings *Phytophthora* über die DNA-Analytik darstellen, wobei mit Hilfe von spezifischen Fänger-DNA-Sequenzen *Phytophthora*-Arten unterschieden und damit die hohe Spezifität der Messmethode gezeigt werden soll. Nach der Überprüfung des Potentials der Einzelpartikelsensorik für einen Nachweis einer Antigen-Antikörper-Interaktion, soll ein direkter Vergleich von SPR und LSPR durchgeführt werden, bei dem die Darstellung der Nachweisgrenzen der Analyt-Detektion sowie der Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode beabsichtigt werden.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien (siehe Anhang D) wurden von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), VWR International GmbH (Merck, Dresden), biomers.net GmbH (Ulm), BBIInternational (Cardiff, UK) und Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg).

3.1.2. Puffer/Lösungen

In den Experimenten kamen folgende Puffer bzw. Lösungen zum Einsatz:

Puffer	Zusammensetzung
10 x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 26,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$ 2,4 g KH_2PO_4 → in 800 ml H_2O lösen → pH 7,4 mit HCl einstellen → auf 1000 ml mit H_2O auffüllen
20 x SSC	3 M NaCl 300 mM Natriumzitat
20 % SDS	20 g Natriumdodecylsulfat (SDS) auf 100 ml H_2O

Tabelle 3.1: Auflistung der verwendeten Puffer/Lösungen sowie deren Zusammensetzung.

3.1.3. Nanopartikel

Für die Versuche wurden sowohl kommerziell erhältliche Gold- und Silbernanopartikel der Firma BBIInternational als auch selbst-synthetisierte Nanopartikel verwendet. Bei letzteren wurden 15 nm große Zitrat-umhüllte Goldpartikel nach der Methode von Turkevich [Frens 1973, Turkevich 1951] synthetisiert und anschließend als Keime für das Wachstum größerer Goldnanopartikel mit Durchmessern von 24-96 nm nach der Methode von Jana [Jana 2001]

verwendet. Die optische Charakterisierung sowie die Bestimmung der Größenverteilung dieser Partikel erfolgten mit den später beschriebenen mikroskopischen Methoden (AFM, REM, TEM, Dunkelfeldmikroskopie). Die Vorteile der käuflich erworbenen Nanopartikel lagen bei ihrer schmalen Größenverteilung (Variationskoeffizient $< 8 \%$) und der Anzahl an sphärischen Partikeln ($> 95 \%$) in der Lösung.

Die Silberprismen wurden nach dem von Aherne beschriebenen chemischen Verfahren synthetisiert [Aherne 2008]. Die verwendeten Goldprismen wurden von einem Kooperationspartner aus Portugal bezogen und nach dem Protokoll von Miranda hergestellt [Miranda 2010].

Elektronenlithographisch hergestellte Nanostrukturen

Neben der chemischen Synthese der oben erwähnten Nanopartikel (auch *bottom up*-Methode genannt) kamen auch Nanopartikel zur Anwendung, die mittels Elektronenstrahlolithographie hergestellt wurden (zu den sogenannten *top down*-Methoden gehörend). Dabei wird ein mit Indiumzinnoxid (*engl. indium tin oxide*, ITO) bedecktes Glassubstrat, welches dadurch die für die Elektronenstrahlbelichtung benötigte elektrische Leitfähigkeit hat, mit Polymethylmethacrylat (PMMA) beschichtet. Anschließend werden mit Hilfe eines Elektronenstrahls die gewünschten Nanostrukturen in das PMMA „geschrieben“. Nach der Entwicklung des Substrates sind die späteren Nanostrukturen als Lücken im PMMA sichtbar. Im folgenden Schritt wird die Probe mit Gold bedampft, wodurch sich ein dünner Goldfilm auf dem PMMA als auch in den Zwischenräumen bildet. Abschließend wird der restliche Goldfilm durch Lösen des PMMA in Aceton „geliftet“, so dass lediglich die Goldstrukturen, die durch den Goldfilm in den Lücken des PMMA entstanden sind, zurückbleiben [Craighead 1984, Pease 1981]. Alle in den Versuchen erwähnten Scheiben-, Ring- und Spaltringstrukturen aus Gold wurden nach diesem Verfahren hergestellt. Die Bereitstellung der Goldscheiben erfolgte durch das Institut für Angewandte Physik (IAP) Jena. Die Höhen wurden mittels AFM (50-65 nm) und der Durchmesser mittels Elektronenmikroskopie (90-110 nm) gemessen. Der Durchmesser der Ringstrukturen lag bei 98 ± 2 nm und die Höhe bei 32 ± 2 nm, der Durchmesser der Spaltringe lag bei 78 ± 3 nm und die Höhe bei 32 ± 6 nm. Die breite des Spaltes betrug dabei 25 ± 4 nm. Die Ring- und Spaltringstrukturen wurden an der Karl-Franzens-Universität in Graz (Österreich) hergestellt.

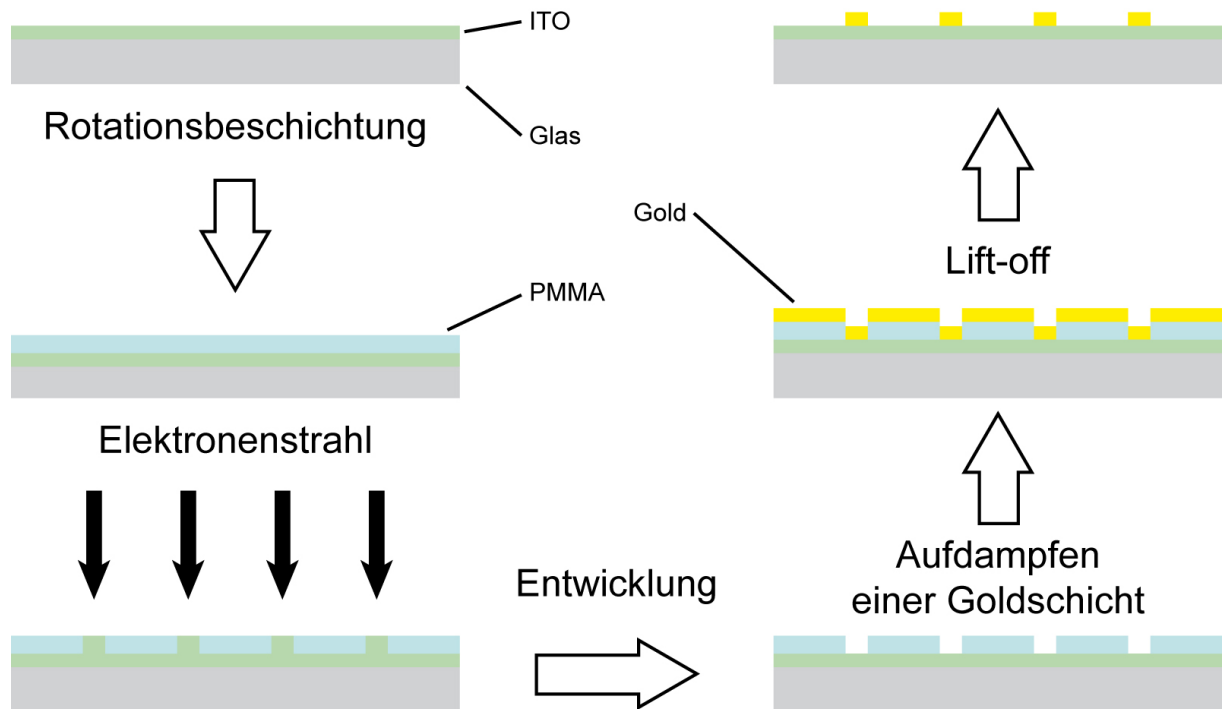


Abbildung 3.1: Herstellung von Gold-Nanostrukturen durch Elektronenstrahl-Lithographie und thermischer Evaporation mit anschließendem Lift-off. Die mit ITO beschichteten Glassubstrate gewährleisten die elektrische Leitfähigkeit, die für die Elektronenstrahlbelichtung erforderlich ist.

Streptavidin-Goldnanopartikel

Für die Versuche zur Signalverstärkung des LSPR-Signals wurden kommerziell erhältliche Streptavidin-Nanopartikel-Konjugate der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Der Durchmesser der Goldnanopartikel betrug hierbei 20 nm. Das verwendete Streptavidin wird von den Bakterien der Spezies *Streptomyces avidinii* produziert.

3.1.4. Oligonukleotide

Die verwendeten Einzelstrang-DNA-Moleküle wurden von der Firma biomers.net GmbH synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt. Sie wurden jeweils lyophilisiert geliefert und wurden in entsprechendem Volumen ddH₂O gelöst, um Stammkonzentrationen von 100 - 500 µM herzustellen. Die Basenabfolge sowie die endständigen Modifizierungen der Oligonukleotide sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Name	Länge	Sequenz [5' → 3']	Modifizierung
A3	30	SH - (CH ₂) ₆ - (A) ₁₀ - TGC TTT TAT CGG GCG GAA TG	5'-Thiol
A3B	30	SH - (CH ₂) ₆ - (A) ₁₀ - TGC TTT TAT CGG GCG GAA TG - b	5'-Thiol, 3'-Biotin
U3	20	TGC TTT TAT CGG GCG GAA TG	-
U3c	20	CAT TCC GCC CGA TAA AAG CA	-
Linker	46	CCT CAC AAT ACC ACA GAG TCC ATT TCC ATT CCG - CCC GAT AAA AGC A	-
Linker2	72	CCT CAC AAT ACC ACA GAG TCC ATT TCC CTC ACA - ATACCACAGAGTCCATTTCCATTCCGCCCGATAAAAGCA	-
Fill	20	GAC TCT GTG GTA TTG TGA GG	-
U3cB	30	b - (CH ₂) ₆ - (A) ₁₀ - CAT TCC GCC CGA TAA AAG CA	5'-Biotin
cKER	30	SH - (CH ₂) ₆ - CCT TTT TTT GTG TGC ACG CTT TCG GGC GTT	5'-Thiol
KER	30	AAC GCC CGA AAG CGT GCA CAC AAA AAA TTG	-
cRAM	30	SH - (CH ₂) ₆ - GAA ACT TGT GTT GGC GGC TTC GGC TGC TGG	5'-Thiol
RAM	30	CCA GCA GCC GAA GCC GCC AAC ACA AGT TTC	-

Tabelle 3.2: Auflistung der verwendeten Einzelstrang-DNA-Moleküle nach Name, Länge in Basenpaaren, Sequenz und Modifizierung der 3'- bzw. 5'-Enden.

3.1.5. Proteine/Peptide

Der verwendete Antikörper (anti-BSA A23-A/D3; Art. sc-65701) wurde von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg) bezogen. Es handelt sich dabei um einen monoklonalen Antikörper, welcher spezifisch an Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*; BSA) bindet. Das Protein BSA (66 kDa; ≥ 98%) wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen (Produkt-Nr. 05477).

3.1.6. Substrate

Für die LSPR-Sensorik wurden Glassubstrate (8,3 x 8,3 x 0,5 mm) verwendet, welche für die Lokalisierung von immobilisierten Nanostrukturen mit einer metallischen Gitterstruktur (25 x 25 Kästchen) versehen wurden. Zur photolithographischen Mikrostrukturierung wurde eine 100 nm Nickel-Chrom-Schicht verwendet. Dadurch war ein späteres Wiederfinden der angebundenen Nanopartikel möglich. Für die SPR-Spektroskopie wurden Glaschips der Firma XanTec bioanalytics GmbH (Münster) bezogen. Diese Substrate (12 x 12 x 0,3 mm) wurden speziell für das SPR-Spektrometer SR7000DC der Firma Reichert Inc. (Depew, NY, USA) hergestellt. Der Goldfilm (ca. 50 nm dick) wird dabei über eine 5 nm dünne Titan-Haftschrift auf das Glassubstrat aufgebracht.

3.1.7. Geräte/Software

Die verwendeten Geräte sowie die Software zur Aufnahme und Auswertung der Daten sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Proben- bearbeitung	<ul style="list-style-type: none"> • Thermomixer Comfort (Eppendorf GmbH, Köln) • Hybridisierungsöfen HB-1000 (UVP Inc., Upland, CA) • Ultraschallbad Bandelin Sonorex (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin) • Vortex Genie 2 (Scientific Industries; NY, USA) • Plasma-Stripper 200-G (Technics Plasma GmbH, Racine, WI, USA)
Charakte- risierung	<ul style="list-style-type: none"> • Rasterkraftmikroskop <i>Nanoscope IIIa</i> Controller mit Messkopf <i>Dimension 3100</i> (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) • Rasterelektronenmikroskop <i>Jeol JSM 6700 F</i> (Jeol Europe B.V., Zaventem, Belgien) • Dunkelfeldmikroskop <i>Axiolmager.Z1m</i> (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) • Spektrophotometer <i>SpectraPro 2300i</i> (PI Acton, Trenton, NJ, USA) • SPR-Spektrometer <i>SR2000DC</i> (Reichert Technologies, Depew, NY, USA) • SPR-Pumpensystem <i>SR7500</i> (Reichert Technologies, Depew, NY, USA)
Datenver- arbeitung	<ul style="list-style-type: none"> • Steuerung, Datenaufnahme und Datenverwaltung vom <i>Nanoscope IIIa : SPM 5.31 R1</i> (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) • Mikroskop-Software: <i>AxioVision 40</i> (Version 4.8.2.0) • Mikrospektrometer-Software: <i>WinSpec/32</i> (Version 2.5.22.0) • Datenanalyse: <i>Origin 8G</i> (OriginLab Corporation) • SPRS-Software: <i>SPRV4</i> (Version 4.0.17) • Software SPR-Pumpe: <i>SR7500 pump</i> (Version 1.0.0.11) • Datenanalyse SPRS: <i>Scrubber 2</i> (Version 2.0b; Biologic Software) • Analyse Oligonukleotide: <i>Vector NTI Suite 7.1</i> (Invitrogen)

Tabelle 3.3: Auflistung der für die Experimente verwendeten Gerätschaften sowie die entsprechende Software zur Datenaufnahme bzw. deren Prozessierung.

3.2. Methoden

Die Präparation des Nanosensors für die LSPR-Spektroskopie sowie die Vorbehandlung der Substrate für die SPR-Spektroskopie ist im folgenden Abschnitt dargestellt. Zunächst wird auf die Funktionalisierung der jeweiligen Oberfläche eingegangen. Nach einer detaillierten Beschreibung der Analyt-Anbindung werden die verwendeten Charakterisierungsmethoden erläutert.

3.2.1. Substratpräparation

3.2.1.1. Reinigung der Chromgitter-Chips

Die im Reinraum des IPHT hergestellten Chromgitter-Chips sind zunächst noch mit einem Schutzlack beschichtet, um die aufgedruckten Chromstrukturen zu schützen. Diese muss im ersten Schritt durch den Einsatz einer Remover Z100-Lösung entfernt werden. Nach 15-minütiger Inkubation in diesem alkalischen Lackablöser werden Lackreste durch einen starken Wasserstrahl entfernt. Anschließend wurden weitere Verunreinigungen der Oberfläche durch jeweils 10-minütige Waschschrte in Aceton, Rotisol, Ethanol und Wasser im Ultraschallbad beseitigt. Die, nach dem Ultraschallbad getrockneten, Substrate wurden im nächsten Schritt in einem Sauerstoff-Plasma-Stripper für 60 min. mit reaktivem Sauerstoff bestrahlt (390 W, 1 mbar), wodurch eine zusätzliche Reinigung bei gleichzeitiger Aktivierung der Chipoberfläche erfolgt. Die so vorbehandelten Chromgitter-Chips mussten zügig der oberflächenchemischen Funktionalisierung zugeführt werden, weil die durch Plasma-Aktivierung erzeugten freien Bindungsstellen schnell wieder abgesättigt werden und somit unter Umständen nicht zur Kopplung zur Verfügung stehen.

3.2.1.2. Silanisierung der Chromgitter-Chips

Um eine bestmögliche Anbindung der Nanopartikel an die Glassubstrate zu ermöglichen, wurden diese in einem weiteren Schritt nasschemisch mit einem Organosilan modifiziert [Fang 1998]. Bei dem verwendeten Silan handelte es sich um 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTES), welches die Oberfläche mit einer Aminogruppe funktionalisiert. Hierzu wurde eine einprozentige APTES-Lösung zunächst für 5 min mit Essigsäure aktiviert und anschließend für 10 min auf der Chipoberfläche inkubiert [Schneider 2011]. Nachfolgend konnte mit der Immobilisierung ausgewählter Nanopartikel begonnen werden.

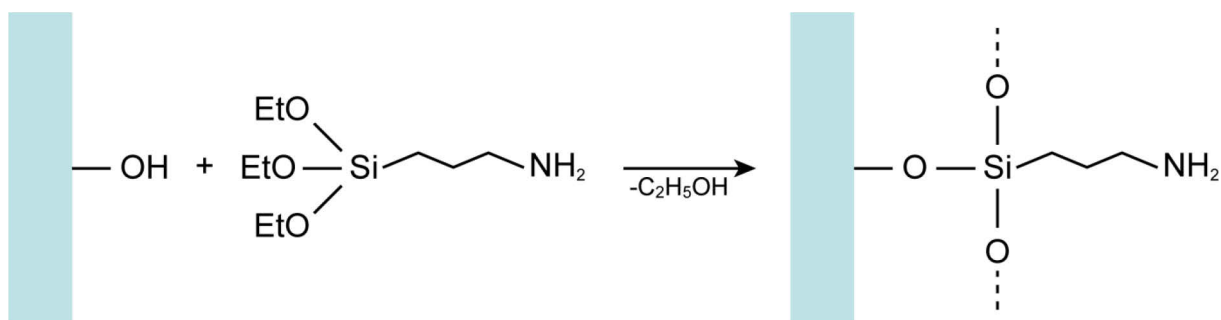


Abbildung 3.2: Reaktionsschema zur Modifizierung der Substratoberfläche mit APTES

3.2.1.3. Immobilisierung der Nanopartikel

Ausschlaggebend für die Anbindung der Nanopartikel an die silanisierte Glasoberfläche ist dabei die kovalente Wechselwirkung zwischen den Aminogruppen des Silans und der Metalloberfläche der Nanopartikel [Grabar 1996]. In den Experimenten wurde die Partikellösung für 1 h bei vorsichtigem Schütteln auf der Chipoberfläche inkubiert. Die Bedeckungsdichten von unter $1 \text{ NP}/\mu\text{m}^2$ konnten dabei über die Konzentration der Nanopartikel ($1,2 \cdot 10^8 \text{ NP/ml}$) eingestellt werden. Nach dem Waschen und Trocknen der Substrate wurden die immobilisierten Nanopartikel mittels Dunkelfeldmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie sowie Mikrospektroskopie charakterisiert. Anschließend konnte die Partikeloberfläche mit Fänger-Molekülen für die LSPR-Sensorik modifiziert werden.

3.2.1.4. Vorbehandlung der SPR-Chips

Analog zu den Chromgitter-Substraten wurden die SPR-Chips in Aceton, Rotisol, Ethanol und Wasser gereinigt, wobei auf die Verwendung des Ultraschallbades verzichtet wurde, um die Goldschicht nicht anzugreifen bzw. diese abzulösen. Da die SPR-Chips ohne spezielle Schutzschicht geliefert wurden, konnte auf den Entlackungsschritt (siehe Abschnitt 3.2.1.1.) verzichtet werden. Nach 15-minütiger Sauerstoff-Plasma-Aktivierung (100 W, 1 mbar) wurde die Oberfläche für die biosensorische Anwendung funktionalisiert.

3.2.2. Funktionalisierung von Goldoberflächen

Um die vorbehandelten Oberflächen (planare Goldschicht oder Goldnanopartikel) mit einer Affinitätsschicht für biosensorische Anwendungen zu versehen, wurde auf die Verwendung von Thiol-Gruppen zurückgegriffen, welche sich durch eine starke Chemisorption zu Edelmetall- (insbesondere zu Gold-) Oberflächen auszeichnen. Diese metallkomplexierende Eigenschaft führt dazu, dass sich mit Thiolen modifizierten Moleküle spontan, mittels der Thiol-

Gruppen, anlagern und mit steigender Konzentration zu hochgeordneten Schichten (*engl. self-assembled monolayer*, SAM) anlagern, sobald sie auf ein Goldsubstrat gegeben werden [Georgiadis 2000, Herne 1997, Levicky 1998, Peterlinz 1997, Ulman 1991, Whitesides 1990]. Nachfolgend wird die Funktionalisierung von Metalloberflächen mit Antikörpern unter Verwendung einer gemischten SAM und mit einzelsträngiger DNA erläutert. Die Inkubation der Glassubstrate (sowohl Fänger-Immobilisierung als auch die Analyt-Anbindung) erfolgte immer in einer kleinen Petrischale mit einem Probenvolumen von 2 ml, wodurch das Substrat vollständig mit der Lösung bedeckt war.

3.2.2.1. Selbstorganisierende Monolagen

Anbindung einzelsträngiger DNA

Um die Goldoberflächen mit einzelsträngiger DNA zu funktionalisieren, wurden synthetisch hergestellte Oligonukleotide der Firma biomers.net GmbH (Ulm) verwendet, welche an ihrem 5'-Ende mit einer Thiol-Gruppe versehen waren. Die Inkubation der Substrate erfolgte anschließend in einem Gemisch aus 1 M KH_2PO_4 [Herne 1997] und der zu immobilisierenden Fänger-DNA ($[c] = 1 \mu\text{mol/l}$) bei Raumtemperatur für zwei Stunden auf dem Schüttler. Danach wurden die Substrate mit Wasser gespült und unter Stickstoff getrocknet.

6-Mercaptohexanol

Um eine bessere Zugänglichkeit der Analyt-DNA zu den immobilisierten Oligonukleotiden zu gewährleisten und unspezifische Wechselwirkungen der Fänger-DNA mit der Goldoberfläche zu vermeiden, wurde nachträglich 6-Mercaptohexanol (MCH) für eine Stunde auf den Substraten inkubiert. Als Folge bildete sich eine sogenannte gemischte selbstorganisierende Monolage (Mixed-SAM) aus MCH und DNA aus, wobei die Thiol-Gruppen von MCH mit denen der Oligonukleotide um Bindestellen auf dem Gold konkurrierten und ein Teil der zuvor gebundenen DNA verdrängten. Zugleich verhindern die Hydroxylgruppen das unspezifische Anlagern der DNA an die Goldoberfläche.

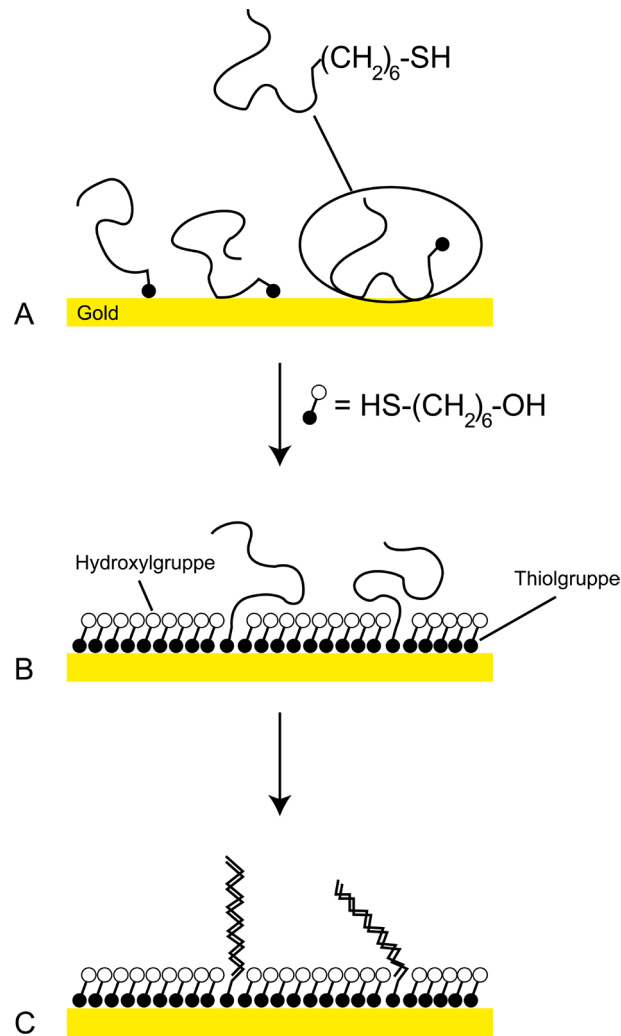


Abbildung 3.3: Steigerung der Hybridisierungseffizienz durch Koadsorption von MCH auf den Goldsubstraten nach Levicky et al. (1998).

11-Mercaptoundekansäure

Zur Funktionalisierung von Goldoberflächen mit Antikörpern bzw. Proteinen bietet sich die Verwendung von 11-Mercaptoundekansäure (*11-mercaptoundecanoic acid*; MUA) an, da dieses Molekül zum einen mit seiner Thiol-Gruppe an die Goldoberfläche und zum anderen mit seiner Carboxylgruppe Proteine kovalent mittels Peptidbindung binden kann. Die Goldsubstrate wurden hierfür über Nacht mit 5 mmol/l MUA (in Ethanol verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit Ethanol und Wasser gewaschen und unter Stickstoff getrocknet. Die hier ausgebildete SAM konnte nun entsprechend mit Fänger-Molekülen modifiziert werden (Abb. 3.4-1).

3.2.2.2. Anbindung von Antikörpern

Für die kovalente Immobilisierung der Antikörper an die 11-Mercaptoundekansäure musste zunächst die Carboxylgruppe von MUA aktiviert werden. Hierfür erfolgte eine Inkubation mit 400 mmol/l 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid (EDC) und 100 mmol/l N-Hydroxysuccinimid (NHS). Dieser EDC/NHS-Komplex bildete auf der Oberfläche aktive Ester (Abb. 3.4-2), welche mit der Aminogruppe des anzubindenden Antikörpers reagierten und eine stabile Peptidbindung ausbildeten (Abb. 3.4-3). Die anschließend noch freien reaktiven Carboxylgruppen wurden durch die Zugabe von 1 mol/l Ethanolamin (20 min bei RT) geblockt (Abb. 3.4-4). Das Reaktionsprinzip ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

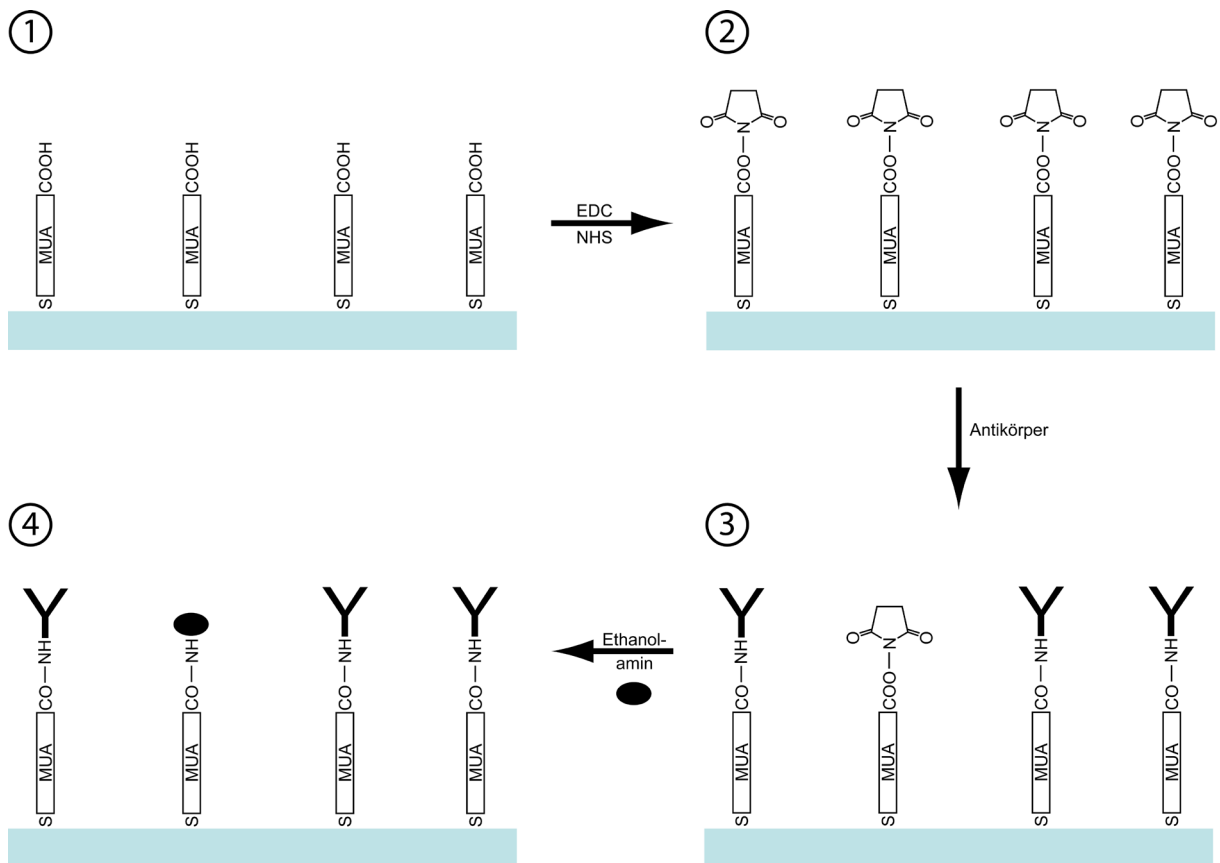


Abbildung 3.4: Aktivierung der Carboxylgruppen über reaktive NHS-Ester zur kovalenten Anbindung von Antikörpern an MUA.

3.2.3. Anbindung der Analytmoleküle

3.2.3.1. DNA-Hybridisierung

Die verwendete Hybridisierungstemperatur wurde anhand der Schmelztemperatur (T_m) der zu hybridisierenden Sequenzabschnitte bestimmt. Als Ausgangspunkt diente die vom Hersteller der Oligonukleotide kalkulierte T_m für Hybridisierungen in Lösung. Diese Schmelztemperatur ist in erster Linie von der Länge der Basensequenz sowie dem Gehalt an Guanin und Cytosin abhängig. Da sich negativ geladene DNA-Stränge abstoßen, begünstigen monovalente Kationen durch ihre Ladungsabschirmung die DNA-Duplexbildung. Folglich müssen neben der Länge und Basenzusammensetzung des Doppelstranges auch die im Hybridisierungspuffer vorliegenden Salzkonzentrationen berücksichtigt werden. Die Einbeziehung dieser und der verwendeten DNA-Konzentrationen erfolgte mit dem Programm *Vector NTI Suite 7.1* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), welches darüber hinaus zusätzlich thermodynamische Aspekte berücksichtigte. Nach Fotin wird die Duplexbildung bei einer Festphasen-basierten Hybridisierung energetisch begünstigt, weshalb eine weitere Anpassung der Hybridisierungstemperatur nach der empirischen Formel (siehe Formel 9) von Fotin erfolgte [Fotin 1998]. Durch Testversuche mit davon abweichenden Temperaturen wurde die Hybridisierungstemperatur hinsichtlich ihrer Spezifität und Selektivität für die spezielle Anwendung optimiert.

$$T_{\text{Chip}} [^{\circ}\text{C}] = 1,2 \times T_m [^{\circ}\text{C}] - 27,8 \text{ } ^{\circ}\text{C} \quad (9)$$

Die Analyt-DNA wurde in dem Hybridisierungspuffer 5 x SSC (pH 7,0) aufgenommen und auf die Chipoberfläche gegeben. Die Inkubation erfolgte dann für 2 h in einem Hybridisierungs-ofen bei optimierter Hybridisierungstemperatur. Anschließend wurden ungebundene bzw. unspezifisch gebundene DNA-Moleküle in einem stringenten Waschprozess entfernt. Hierfür wurden die Substrate jeweils für 5 min in 2 x SSC, 0,2 x SSC und H₂O gewaschen und danach mit Stickstoff getrocknet.

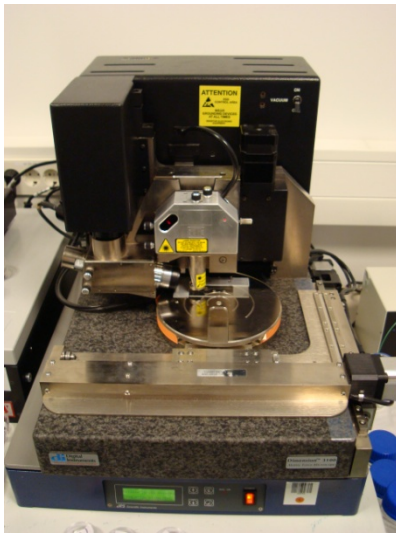
3.2.3.2. Anbindung von Proteinen (Antigenen)

Die Anbindung der nachzuweisenden Proteine bzw. Antigene erfolgte in 1 x PBS für 2 h bei Raumtemperatur, wobei eine Konzentration von 1,5 $\mu\text{mol/l}$ verwendet wurde. Anschließend wurden unspezifisch bzw. nicht gebundene Moleküle mit Wasser abgewaschen und mit Stickstoff getrocknet.

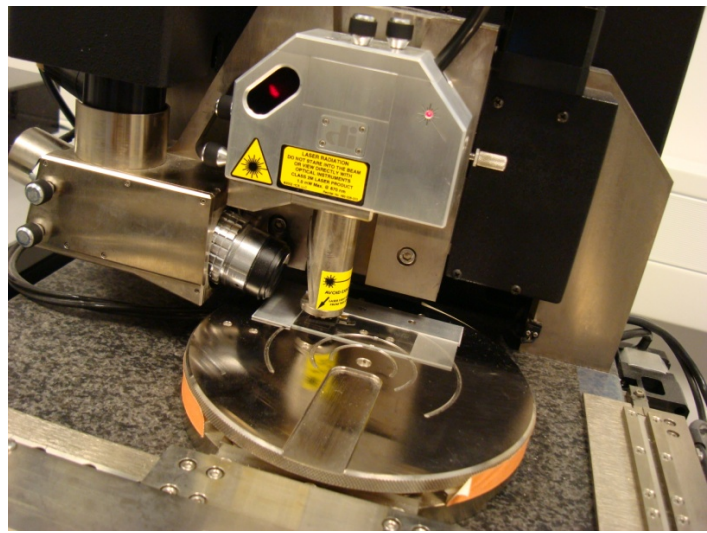
3.2.4. Charakterisierung

3.2.4.1. Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*; AFM, [Binnig 1986]) wurde zur Auflösung der Oberflächentextur oben genannter Substrate bzw. zur Charakterisierung darauf gebundener Nanostrukturen verwendet. Hierbei kam ein *NanoScope IIIa* mit einem *Dimension 3100*-Messkopf der Firma Digital Instruments (Santa Barbara, CA, USA) sowie *BudgetSensorsTM BS-Tap300-G*-Spitzen (Innovative Solutions Bulgaria Ltd., Sofia, Bulgarien) aus Silizium (300 kHz Resonanzfrequenz, 40 N/m Kraftkonstante, Spitzenradius < 10 nm) zum Einsatz.



(A)



(B)

Abbildung 3.5: Laboraufnahme des verwendeten Rasterkraft-Mikroskops NanoScope IIIa (A) mit dem Dimension 3100-Messkopf (B).

Die Messungen der Proben erfolgten im sogenannten „*tapping-Modus*“ an Luft mit einer gewählten Abtastfrequenz von 0,1 bis 0,5 Hz. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln, wobei sich die dabei gewählten Dimensionen maßgeblich nach dem jeweiligen Untersuchungsobjekt richteten. Über den Sollwert-Parameter der Amplitude im Setpoint konnte die Einstellung der durch die AFM-Spitze ausgeübten Kraft reguliert werden. Die Proben wurden im Topographiemodus gescannt und die erhaltenen Daten anschließend mit der Software *NanoScope SPM 5.31R1* (Digital Instruments, Santa Barbara, CA; USA) ausgewertet.

3.2.4.2. Rasterelektronenmikroskopie

Die auf den Chromgitter-Chips immobilisierten Nanopartikel wurden begleitend mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) charakterisiert (*Jeol JSM 6700F*, Jeol Europe B.V., Zaventem, Belgien). Entgegen dem üblichen Verfahren wurden die Proben nicht mit Gold besputtert, da sich die metallischen Nanopartikel durch ihre unregelmäßige Anordnung auf der Oberfläche ausreichend kontrastreich darstellen lassen.

3.2.4.3. Dunkelfeldmikroskopie

Eine Methode zur Visualisierung von Nanopartikeln ist die Dunkelfeldmikroskopie. Hierbei handelt es sich um ein Mikroskopieverfahren, der die räumliche Diskriminierung von Anregungslicht und Streulicht zugrunde liegt. Die Dunkelfeldmikroskopie lässt sich als Auflicht- oder Durchlicht-Modus durchführen, wobei hier besonders der letzte Fall aufgrund seines hohen Kontrasts (siehe Abbildung 3.6) im Vergleich zur Auflicht-Beleuchtung verwendet wurde.

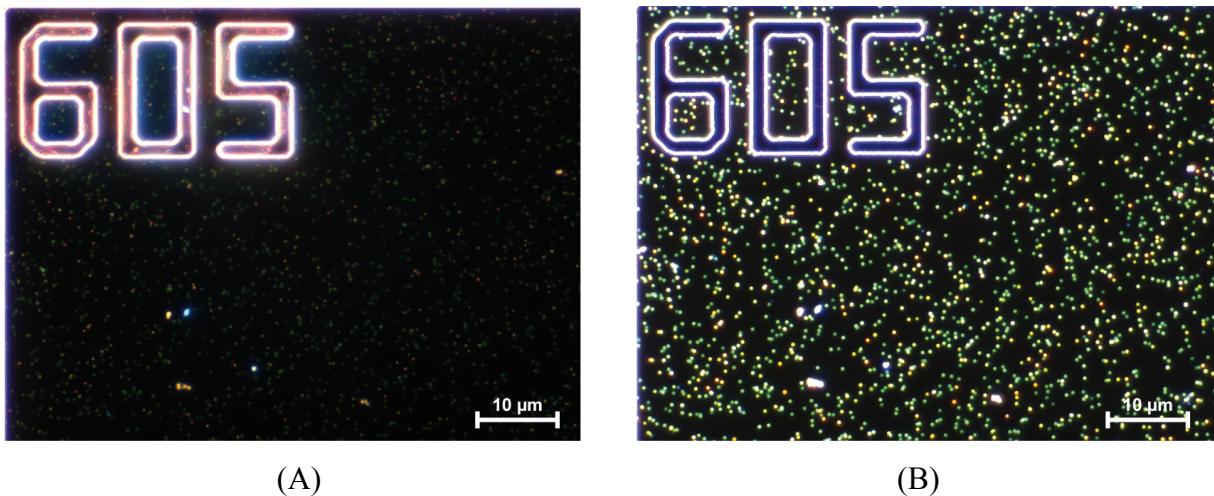


Abbildung 3.6: Vergleichende Aufnahmen von auf Glas immobilisierten Goldnanopartikeln (80 nm Durchmesser). Die Dunkelfeld-Anregung erfolgte dabei (A) im Auflicht und (B) im Durchlicht.

Das Prinzip der Durchlicht-Dunkelfeldmikroskopie wird in Abbildung 3.7-A verdeutlicht. Als Anregungsquelle dient hier typischerweise eine 100 W Halogenlichtquelle, deren Licht in einen Dunkelfeldkondensor eingekoppelt wird. Über eine Optik, bestehend aus Hohlspiegel, Kugelspiegel und Dunkelfeldkondensor, wird das Licht auf die Probe fokussiert, wobei ein hohler Lichtkegel mit einer numerischen Apertur (NA) zwischen 1,2 und 1,4 erzeugt wird. Das verwendete Objektiv muss daher eine kleinere NA aufweisen, um das Aufsammeln von

Anregungslicht zu verhindern. Dazu wurde auf ein 100x-Objektiv mit einer NA von 0,9 zurückgegriffen.

Befindet sich kein Objekt im Lichtfokus, wird vom Betrachter lediglich ein schwarzes Bild wahrgenommen, was gleichbedeutend mit einer nahezu hintergrundfreien Detektion ist. Bringt man nun streuende Objekte, wie beispielsweise metallische Nanopartikel, an die gleiche Stelle, sind diese dagegen kontrastreich vor dem dunklen Hintergrund sichtbar. Verdeutlicht wird das in Abbildung 3.7-B, die eine Probe mit metallischen Nanopartikeln unterschiedlicher Größe und Form zeigt. Da selbst kleinste Schmutzpartikel als starke Streuobjekte wirken können, wird eine hohe Anforderung an die Sauberkeit der Probe gestellt.

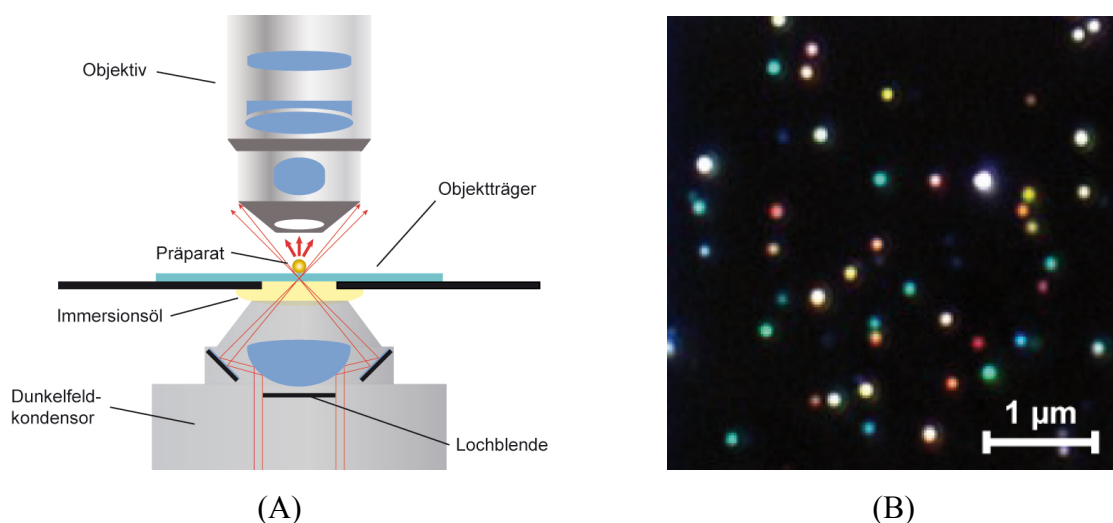


Abbildung 3.7: (A) Schematischer Aufbau einer Durchlicht-Dunkelfeld-Anordnung mit einem Dunkelfeldkondensor und Immersionsöl-Aufsatz. Es wird nur das vom Präparat gestreute Licht vom Objektiv für den Betrachter sichtbar und gewährt somit einen hohen Kontrast des Objektes. (B) Echtfarbenfotografie einer Probe mit metallischen Nanopartikeln. Jeder Lichtpunkt stammt dabei entweder von einzelnen oder sehr eng zusammenliegenden Nanoteilchen. Die unterschiedlichen Farben sind auf verschiedene Partikelgrößen, Partikelformen und Materialien (Gold und/oder Silber) zurückzuführen.

3.2.5. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Die Detektion von molekularen Bindeereignissen auf planaren Goldsubstraten wurde mit Hilfe des SPR-Spektrometers SR7000DC der Firma Reichert durchgeführt. Die Anregung der Oberflächenplasmonen wird dabei durch eine LED-Lichtquelle realisiert, die Licht mit einer Wellenlänge von 780 nm emittiert, wobei die optische Einkopplung über ein Saphir-Prisma (Brechungsindex $n_{\text{Prisma}} = 1,767$) nach der in Abschnitt 2.2.1.1. beschriebenen Kretzschmann-Anordnung erfolgt. Den Kontakt zwischen Prisma und Sensorchip wird durch Immersionsöl

(Brechungsindex $n_{\text{OI}} = 1,4$) hergestellt, um die korrekte Lichteinkopplung zu gewährleisten. Die Goldoberfläche befindet sich im Messaufbau auf der Oberseite des Chips und wird durch einen Deckel mit zwei Kanälen abgedeckt. Ein Kanal dient dabei als Probenkanal, der andere fungiert als Referenz für die Messung. Der Laufpuffer wird über ein Pumpensystem (SR7500) über beide Kanäle gepumpt. Zwischen Pumpe und Probenkammer befindet ein Einspritzsystem mit einem Probenschlauch, über den die Zufuhr der Analytlösung auf das Goldsubstrat gesteuert wird. Die Ansteuerung der Pumpe als auch des SPR-Spektrometers wird durch zwei Programme realisiert, wobei die Pumpen-Software lediglich die Geschwindigkeit des Laufpuffer-Stroms regelt, während die Spektrometer-Software das von einem Photodioden-Array detektierte Signal in ein Sensorgramm umrechnet. Die Ordinate gibt dabei die gemessene Winkelverschiebung des Intensitätsminimums im reflektierten Lichtstrahl mit der Einheit μRIU an, was gleichbedeutend mit einer Winkeländerung von $7,3 \cdot 10^{-5}$ Grad ist. Auf der Abszissenachse ist der zeitliche Verlauf der Messung dargestellt.

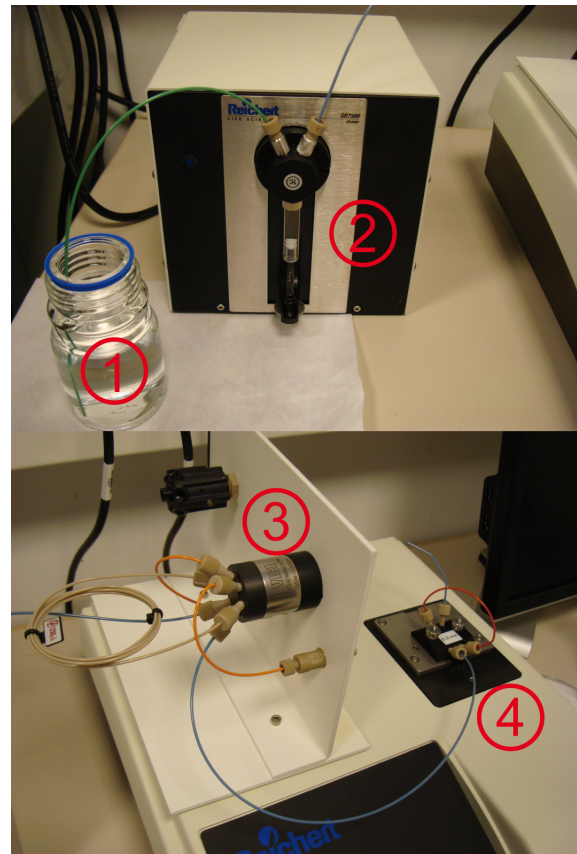


Abbildung 3.8: Aufbau SPR-Messplatz. Abgebildet ist der Laufpuffer (1), das Pumpensystem SR7500 (2), das Injektionsventil mit Probenschlauch (3) und das SPR-Spektrometer SR2000DC mit der Zweikanal-Kammer (4).

Die ermittelten Sensorgramme wurden mit der Hilfe der „Scrubber 2“-Software, die speziell für die Simulation und Analyse von SPRS-Daten entwickelt wurde, ausgewertet. Einzelne Messkurven können dabei auf die Basislinie normiert werden. Das Referenz- und Puffer-signal kann subtrahiert werden und aus den angepassten Kurven lassen sich Assoziations- bzw. Dissoziationsraten bestimmen, wodurch Aussagen über die Kinetik der untersuchten Bindeereignisse getroffen werden können. Messungenauigkeiten wurden durch Mehrfachmessungen und anschließender Mittelung der Daten ausgeglichen.

3.2.6. Mikrospektroskopie

3.2.6.1. Hintergrund und Prinzip

Die Mikrospektroskopie (im vorliegenden Fall auch Einzelpartikelspektroskopie genannt) ist eine mikroskopische Variation der konventionellen optischen Spektroskopie, welche die Interaktion von elektromagnetischer Strahlung mit Substanzen studiert, um Informationen über energetische Resonanzen und Übergänge zu erhalten. Plasmonresonanzen in Edelmetall-Nanopartikeln werden spektral mit breitbandiger optischer Extinktionsspektroskopie charakterisiert, solange die Resonanzen im sichtbaren bzw. nahen Infrarot-Bereich liegen. Das Extinktionsspektrum repräsentiert für plasmonische Nanopartikel die Summe aus gestreutem und absorbiertem Licht, da beides von dem einfallenden Lichtstrahl abgezogen wird.

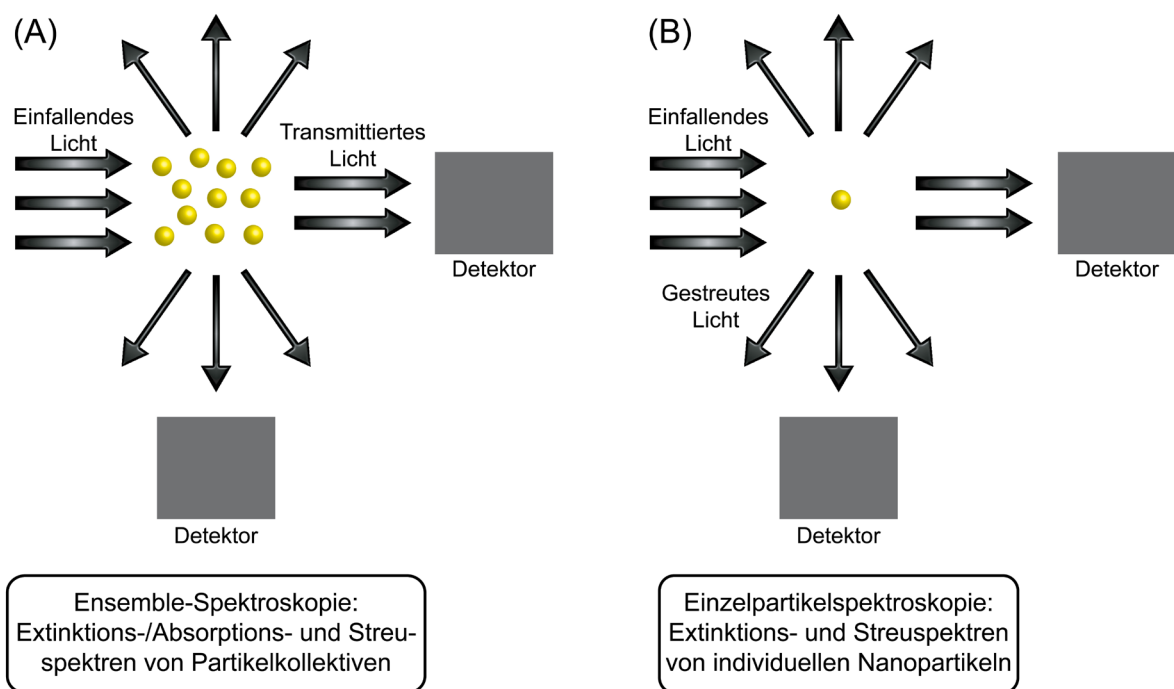


Abbildung 3.9: (A) Ensemble-Spektroskopie: Licht fällt auf eine Ansammlung von Nanopartikeln, die sich in Lösung oder auf einem Substrat befinden. Man erhält Extinktions- oder Absorptionsspektren für Partikelkollektive, die über alle Formen, Größen und Ausrichtungen der Partikel gemittelt sind. (B) Einzelpartikelspektroskopie: Licht wird unter hoher numerischer Apertur auf einzelne Partikel, die auf einem Substrat immobilisiert sind, gestrahlt. Das gestreute Licht wird als Streuspektrum individueller Nanopartikel detektiert.

3.2.6.2. Aufbau Mikrospektroskopie

In Abschnitt 3.2.6. wurde mit der Dunkelfeldmikroskopie eine Methode vorgestellt, mit der metallische Nanopartikel effizient angeregt werden können. Der komplette Detektionszweig des verwendeten Versuchsaufbaus ist schematisch in Abbildung 3.10 dargestellt. Dieser besteht aus einem aufrechten Mikroskop (Zeiss AxioImager.Z1m), das einen unkomplizierten Objektivwechsel durch einen automatischen Objektivrevolver und eine präzise Positionierung der Probe in der x-y-Ebene erlaubt.

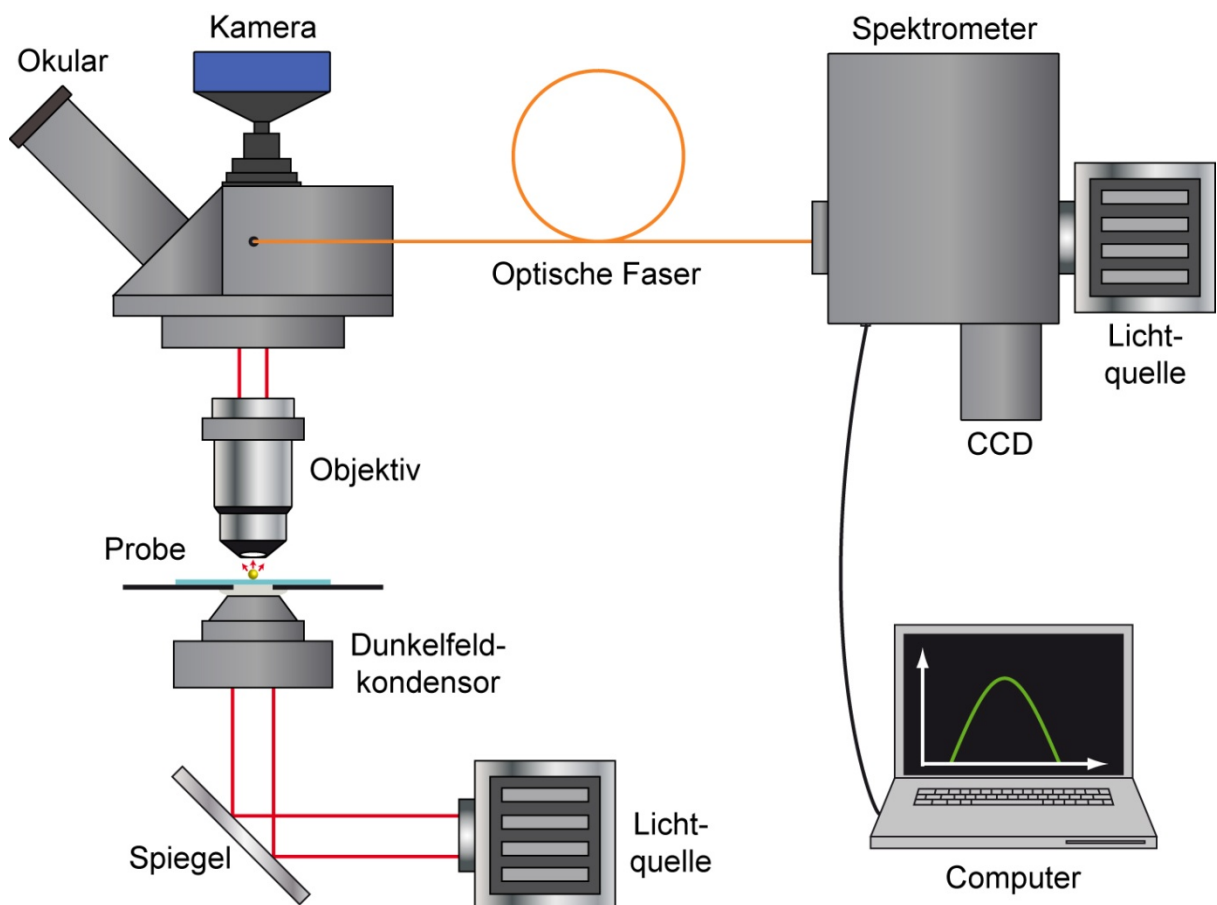


Abbildung 3.10: Schematischer Messaufbau für die Mikrospektroskopie. Eine optische Faser bildet dabei die Verbindung zwischen Dunkelfeldmikroskop und Gitterspektrometer zur spektralen Auswertung des gestreuten Lichts individueller Nanopartikel.

Die Lichteinstrahlung erfolgt durch einen Dunkelfeldkondensor mit einer numerischen Apertur von $NA = 1,2 - 1,4$. Das Glassubstrat wird dabei unter Verwendung eines kleinen Tropfens Immersionsöl auf einen Glasobjektträger aufgebracht. Dieser wird wiederum direkt über dem Dunkelfeldkondensor aufgelegt, welcher ebenfalls für die Verhinderung von unspezifischer Lichtbrechung mit Immersionsöl benetzt wird. Das durch den Dunkelfeldkondensor

schräg einfallende Weißlicht (Halogenlichtquelle HAL 100; Zeiss) wird von den immobilisierten Nanopartikeln reflektiert, absorbiert und/oder gestreut. Durch die Dunkelfeldanordnung wird vom Objektiv (100-fache Vergrößerung, $NA = 0,9$) lediglich das Streulicht der Nanopartikel aufgenommen und über einen Strahlteiler zum Okular sowie zu einer optischen Faser weitergeleitet werden, welche das Licht dann an das Gitterspektrometer zur Auswertung weitertransportiert. Das Objektivbild wird dabei auf einer Lochblende mit einem Durchmesser von $150\ \mu\text{m}$ abgebildet, wodurch nur ein geringer Teil des Streulichts der Nanopartikel aus dem Objektivbild in die Faser gelangen kann. Der Durchmesser der Lochblende wurde so gewählt, dass nur das Streulicht eines Nanoteilchens an das Spektrometer weitergeleitet wird und benachbarte Partikel ausgeblendet werden. Der Strahlengang sowie die Abbildung des Partikelstreulichts sind in Abbildung 3.11 schematisch dargestellt.

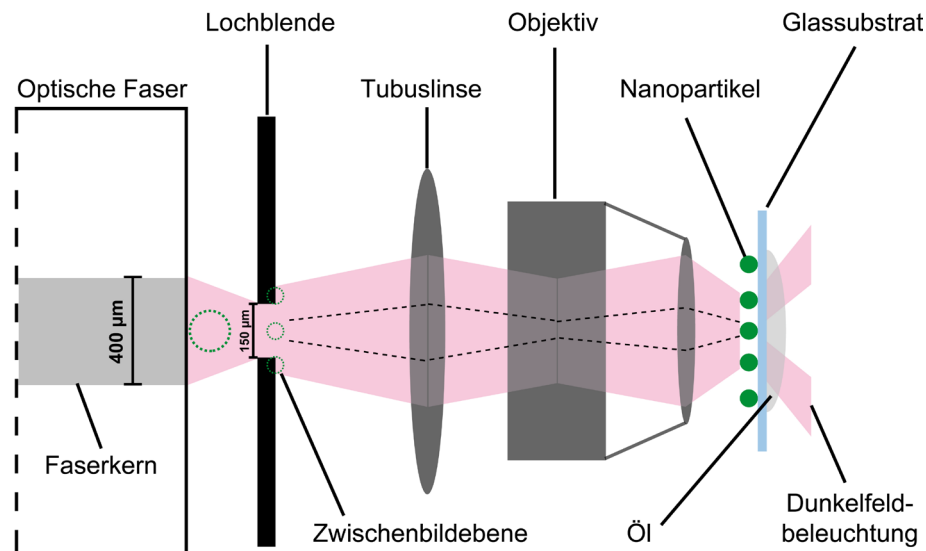


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Bildebenen bis zur optischen Faser. Eine Lochblende vor der Faser lässt nur das gestreute Licht einer kleinen Fläche in die Faser, wodurch die spektrale Auswertung eines einzelnen Nanopartikels ermöglicht wird.

Das Spektrometer ist mit einem Gitterwechsler ausgestattet, der die Wahl unterschiedlicher Gitter (150, 600 und 1200 Linien pro mm) erlaubt. Als Detektor dient eine Kamera von Princeton Instruments, die direkt an das Spektrometer angekoppelt ist. Sie besitzt einen rückseitig beleuchteten *Full-Frame-CCD*-Chip mit 256×1024 Pixeln, die jeweils $26\ \mu\text{m} \times 26\ \mu\text{m}$ groß sind. Zur Verminderung thermischen Rauschens wird der CCD-Chip der Kamera peltiergekühlt. Die optimale Betriebstemperatur liegt bei etwa $-75\ ^\circ\text{C}$ und wird elektronisch auf diesen Wert stabilisiert. Während der Messungen öffnet sich eine elektromechanische Ver-

schlussklappe, der zwischen Eintrittsspalt und Spektrometer angebracht ist. Die geschlossene Verschlussklappe verhindert nicht nur die Beschädigung des empfindlichen CCD-Chips durch (Tages-) Licht, gleichzeitig wird verhindert, dass während des Ausleseprozesses Licht auf den Chip fällt und die dabei registrierten Photonen falschen Pixeln zugeordnet werden (*Smear-Effekt*). Die Steuerung des Spektrometers und der CCD Kamera erfolgt mit der kommerziellen Software WinSpec32 (Princeton Instruments).

Für die Messung des Streuspektrums eines einzelnen Nanopartikels wird zunächst der Messbereich über eine Spektrometer-Lichtquelle (Wellenlänge = 550 nm) auf der Probenoberfläche als grüne Kreisfläche sichtbar gemacht. Diese Messfläche kann auf ein einzelnes Nanoteilchen (bzw. dessen im Dunkelfeld sichtbare Streuscheibe) mit Hilfe des x-y-Verschiebetisches justiert werden. Nach Abschalten der Spektrometer-Lichtquelle kann nun das Licht dieses Partikels, wie oben beschrieben, detektiert werden. Das spektral aufgefächerte Streulicht des Nanoteilchens wird von der Software direkt als unkorrigiertes Streuspektrum I_{NP} dargestellt und kann als Datei gespeichert sowie im ASCII-Format für die Datenauswertung exportiert werden. Zusätzlich zu dem unkorrigierten Partikelspektrum ist die Messung des Hintergrundspektrums I_{HG} nötig, um Streulichte effekte des Glassubstrats entfernen zu können. Dazu wird eine Stelle auf der Probe gewählt, in deren Umgebung keine Partikel liegen. Nach Abzug des Hintergrundspektrums müssen auch die spektralen Eigenschaften des Versuchsaufbaus, insbesondere der Anregequelle, korrigiert werden, indem durch das Spektrum des Anregelichts I_{LQ} dividiert wird. Da die Lichtintensität in der Fokusebene des Objektivs nur sehr grob zu bestimmen ist, kann aus der Intensität des gestreuten Lichts kein absoluter Streuquerschnitt für das jeweils vermessene Nanopartikel angegeben werden. Die Spektren werden daher grundsätzlich normiert. Um die Lage der Plasmonresonanz möglichst präzise zu bestimmen, werden die Spektren in der Nähe des Resonanzmaximums (wie oben beschrieben) gefittet, wobei sich die Resonanzlage dann aus den Fitparametern ergibt.

3.2.6.3. Datenanalyse der Streuspektren

Zur Auswertung der mittels Mikrospektroskopie gemessenen Streuspektren wurde das Analyse- und Darstellungsprogramm Origin 8G verwendet. Zunächst erfolgte die Mittelung der Spektren zur Reduzierung des Rauschens. Die anschließende Prozessierung der spektralen Daten erfolgte nach der folgenden Formel:

$$I_{\text{res}} = \frac{I_{\text{NP}} - I_{\text{HG}}}{I_{\text{LQ}} - I_{\text{DS}}} \quad (10)$$

Hierbei steht I_{res} für das aus der Prozessierung resultierende Spektrum, I_{NP} für das unprozessierte Streuspektrum des Nanopartikels, I_{HG} für das Hintergrundspektrum, I_{LQ} für das Lampenspektrum und I_{DS} für das systeminterne Dunkelstromspektrum. Die Prozessierung ist in Abbildung 3.12 veranschaulicht.

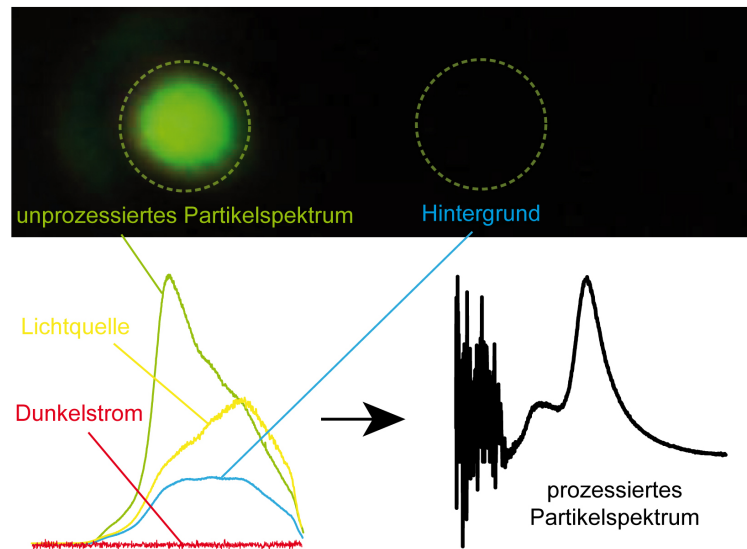


Abbildung 3.12: Prozessierung der durch Mikrospektroskopie gewonnenen Daten. Das resultierende Spektrum (schwarz) setzt sich dabei aus dem unprozessierten Partikelspektrum (grün), dem Hintergrundspektrum (blau), dem Lampenspektrum (gelb) sowie dem systeminternen Rauschen (rot) zusammen.

Nach der Prozessierung der Streuspektren erfolgte die Bestimmung des LSPR-Maximums sowie der spektralen Linienbreite über einen nicht-linearen Kurvenfit. Hierfür kam der sogenannte Extreme-Fit zum Einsatz, welcher als Beispielkurve in Abbildung 3.13-A dargestellt ist. Die Wahl dieser Fit-Funktion erfolgte nach Bestimmung des Chi-Quadrats unterschiedlicher Funktionen, wobei ein besonders kleiner Wert eine gute Übereinstimmung mit dem anzupassenden Spektrum bedeutete. Aus den Fitparametern konnten das Maximum sowie die spektrale Linienbreite direkt bestimmt werden.

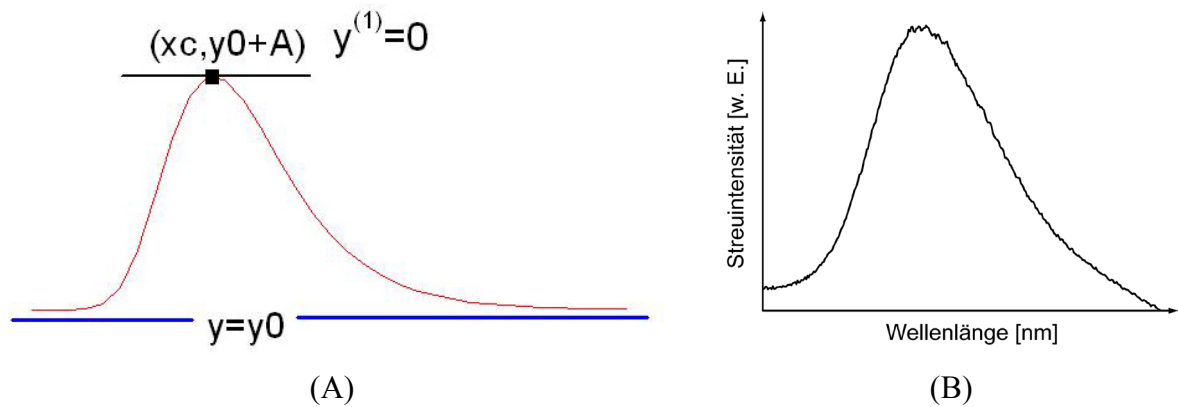
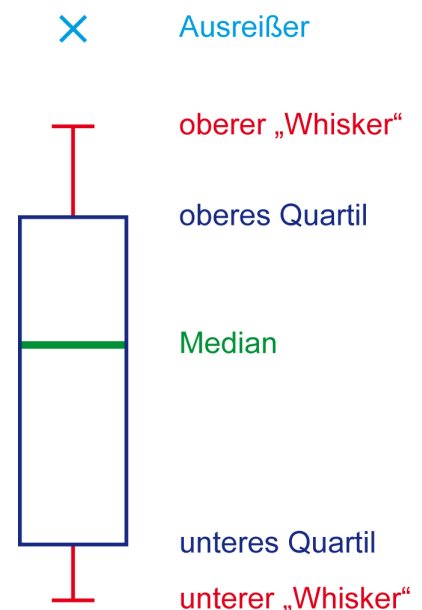


Abbildung 3.13: (A) Graphische Darstellung der verwendeten Fit-Kurve. Der Kurvenverlauf (steiler Anstieg vor und schwacher Abfall nach dem Maximum) ähnelt dabei stark den gemessenen Streuspektren (B) der Goldnanopartikel.

Die prozessierten Daten mehrerer vermessener Partikelspektren werden zur besseren Veranschaulichung in einem sogenannten Boxplot dargestellt. Die Bereiche, in denen sich die Daten befinden, und auch die Verteilung in diesen Bereichen können so graphisch besser vermittelt werden.

Abbildung 3.14: Darstellung eines Box-Plots. Das obere und untere Quartil entsprechen dabei dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Innerhalb der „Whisker“-Grenzen liegen 90 % der Daten, während alle Daten außerhalb davon als Ausreißer markiert sind.



3.2.6.4. Sensitivität und *Figure of Merit* von Nanopartikeln

Die Sensitivität von Nanopartikeln lässt sich aus der experimentell ermittelten Wellenlängenverschiebung der LSPR $\Delta\lambda$ und der Brechungsindexänderung Δn berechnen [Csaki 2011]:

$$S = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n} \quad (11)$$

Es wird dabei zwischen den Sensitivitäten S_B (engl. *bulk sensitivity*) und S_S (engl. *surface sensitivity*) unterschieden, wobei sich S_B auf Brechungsindexänderungen des gesamten Mediums und S_S auf Brechungsindexänderungen durch eine dem Nanopartikel aufgelagerte Schicht bezieht.

Um die Güte von Nanopartikeln auf lokale Brechungsindexänderungen untereinander vergleichen zu können, wurde 2005 durch Sherry ein sogenannter Gütefaktor (*engl. figure of merit*, FOM) eingeführt [Sherry 2005]. Grundlage des FOM ist die durch die Brechungsindexänderung bedingte Verschiebung der Resonanzlage des Nanopartikels. Diese wird der spektralen Linienbreite des jeweiligen Nanopartikels gegenübergestellt und der FOM χ nach folgender Formel bestimmt:

$$\chi = \left| \frac{S}{w} \right| \quad (12)$$

Die spektrale Linienbreite w kann direkt aus den Parametern der Fit-Kurve nach der Spektralanalyse abgelesen werden.

4. Ergebnisse

Die Grundlage des hier beschriebenen Einzelpartikelsensors besteht darin, die optischen Eigenschaften von Edelmetall-Nanostrukturen mit biochemischen Erkennungsmechanismen zu kombinieren. Die plasmonische Nanostruktur, wie z.B. ein Gold-Nanopartikel, dient dabei als optischer Signalwandler, der eine Brechungsindexänderung in seiner Umgebung in eine messbare Verschiebung der Plasmonresonanz umsetzt. Biomolekulare Bindungsereignisse nahe der Partikeloberfläche können lokal den Brechungsindex der Umgebung erhöhen und infolgedessen die Plasmonresonanz zu größeren Wellenlängen verschieben. Zweckmäßigerweise sollte dazu einer der beiden Bindungspartner fest an die Partikeloberfläche gebunden werden. Der folgende Abschnitt befasst sich mit den Ergebnissen der Mikrospektroskopie als Charakterisierungsmethode zur Detektion der optischen Eigenschaften von Nanopartikeln. Es werden die Grenzen dieser Methode für die biosensorische Anwendung beschrieben und die Streueigenschaften unterschiedlicher Nanostrukturen hinsichtlich ihrer Resonanzposition, Streuintensität und spektralen Linienbreite miteinander verglichen. Dabei sollen hauptsächlich chemisch synthetisierte Nanopartikel untersucht werden, da deren Herstellung wesentlich einfacher und ohne großen Geräteaufwand realisierbar war. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, unterscheiden sich die optischen Eigenschaften besonders in Größe, Form und Material der verwendeten Nanopartikel, weshalb diese Parameter für die Wahl des für die Biosensorik geeigneten Signalwandlers untersucht werden sollen.

4.1. Grenzen der Mikrospektroskopie

Um die Mikrospektroskopie für die Biosensorik nutzen zu können, muss im Vorfeld die Sensitivität bezüglich lokaler Brechungsindexänderungen durch die Anbindung von (Bio-) Molekülen untersucht werden. Zudem müssten systeminterne Fehler, welche ebenfalls die Abweichungen des Sensorsignals bewirken können, charakterisiert werden. Diese Parameter sollen bestimmt werden, um in den anschließenden Experimenten entscheiden zu können, wann eine Sensorantwort noch von den angebundenen Analytmolekülen stammt oder lediglich systembedingt ist. Dazu wurden Versuche zur Signalstabilität sowie dem Einfluss von Verunreinigungen während der Wasch- bzw. Inkubationsprozesse durchgeführt. Weiterhin wurden Messeinstellungen wie die Platzierung des Nanopartikels im Messbereich und der Einfluss der Fokusebene auf die Streuspektren untersucht.

4.1.1. Signalstabilität über die Zeit

Zur Untersuchung der *Signalstabilität über die Zeit* wurden die Streuspektren mehrerer Nanopartikel, die im Vorfeld auf einem Glassubstrat angebunden wurden, über einen bestimmten Zeitraum vermessen. Dabei wurden die Spektren in definierten Zeitintervallen aufgenommen, wobei die Probe dabei nicht vom Messplatz entfernt wurde. Abbildung 4.1 zeigt dabei die Ergebnisse für einen Zeitraum von 10 h, was in etwa den Zeitraum für eine komplette Messung (ausgehend von Oberflächenfunktionalisierung bis hin zur Anbindung des Analyten) darstellt. Es konnte keine signifikante Änderung der einzelnen Streuspektren nach deren Prozessierung festgestellt werden, wobei lediglich eine Stelle nach dem Komma berücksichtigt wurde (was für die biosensorische Anwendung als vollkommen ausreichend angesehen wird). Die geringe Abweichung der spektralen Linienbreite von weniger als 0,5 nm hat dabei keinen Einfluss auf die Lage der Streuspektren.

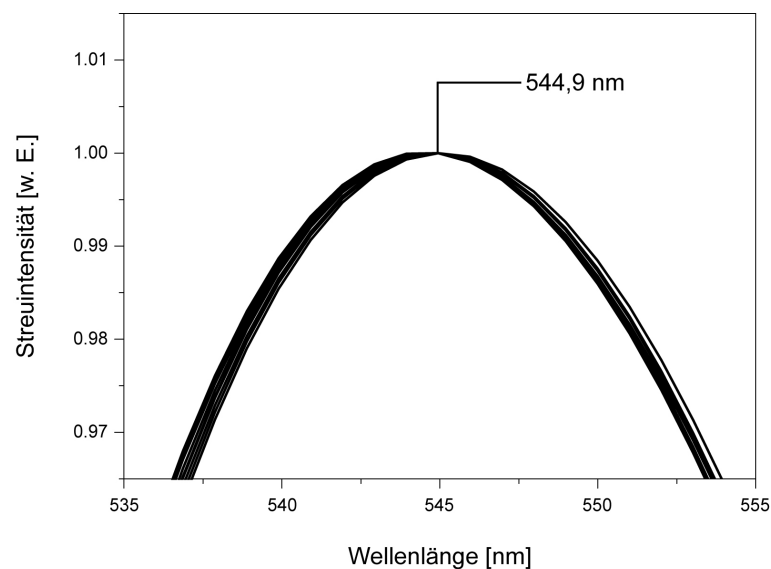


Abbildung 4.1: Mehrfachmessung an einem ausgewählten Nanopartikel über mehrere Stunden. Die Position der Plasmonresonanz bleibt konstant, während lediglich sehr geringe Abweichungen in der spektralen Linienbreite erkennbar sind. Die Probe wurde dabei nicht vom Messplatz entfernt, um unter gleichen Bedingungen messen zu können.

4.1.2. Signalstabilität nach Wasch- und Anbindungsschritten

Da für die einzelnen Inkubationsschritte das Glassubstrat mit den Partikeln von dem Mikroskop entfernt und *Wasch-* bzw. *Anbindungsschritte* durchgeführt werden müssen, ändern sich auch geringfügig die Bedingungen für die Messung der Streuspektren durch angebundene

Biomoleküle auf der einen Seite, aber auch durch Lösungs- bzw. Pufferrückstände auf der Probe. Diese Rückstände können ebenfalls lokale Änderungen des Brechungsindex zur Folge haben, wodurch das Signal der angebundenen Biomoleküle verfälscht wird. Abbildung 4.2 zeigt die Änderungen der maximalen Peakposition einzelner Goldnanopartikel nach einem simulierten Waschprozess mit einem Salzpuffer (2 x SSC) und Wasser sowie anschließender Trocknung im Stickstoffstrom.

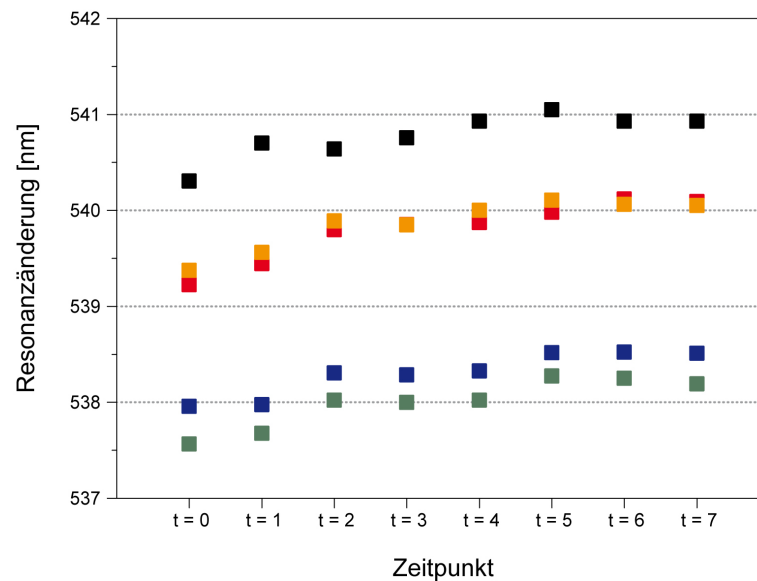


Abbildung 4.2: Messung der Resonanzposition verschiedener Nanopartikel (hier fünf Partikel exemplarisch dargestellt) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zur Simulation der Waschprozesse wurden die Substrate mit den darauf gebundenen Partikeln vor jeder Messung vom Messplatz entfernt, mit Wasser gespült und unter Stickstoff getrocknet. Angegeben ist die Ausgangslage der Plasmonresonanz bei $t = 0$ sowie nach sieben weiteren Waschschritten ($t = 1$ bis $t = 7$).

Leichte Abweichungen der Peakposition sind in diesem Test zu verzeichnen, wobei die mittlere Abweichung über ca. 50 vermessenen Nanopartikeln bei lediglich 0,5 nm (zu höheren Wellenlängen) liegt. Salzablagerungen, aber auch Rückstände von Wasser, können also eine geringfügige Verschiebung bewirken, wodurch Resonanzänderungen durch die Biomolekülanbindung kritisch betrachtet und auf den ermittelten Fehler normiert werden müssen. Gleichzeitig muss jede Rotverschiebung von 0,5 nm oder weniger auf diesen Umstand zurückgeführt werden und dient damit als Auflösungsgrenze der hier verwendeten mikrospektroskopischen Vermessung. Ebenso wird die Inkubation mit Pufferlösung als Negativkontrolle eingesetzt und sollte eine maximale Resonanzänderung von 0,5 nm zu höheren Wellenlängen nicht überschreiten.

4.1.3. Einfluss von Verunreinigungen

Auch der Einfluss von Verunreinigungen der Glassubstratoberfläche durch das verwendete Immersionsöl wurde untersucht (siehe Abbildung 4.3). Dazu wurde nach der Messung des Streulichtspektrums individueller Nanopartikel ein dünner Ölfilm auf die Probe aufgebracht ($n = 1,518$), der eine starke Rotverschiebung des Spektrums zur Folge hatte. Anschließend wurden die Partikel nach einem Waschprozess mit Wasser sowie nachfolgendem reinigenden Plasmastricken erneut vermessen, wobei das ursprüngliche Streuspektrum der Nanopartikel nahezu wieder hergestellt werden konnte. Nahezu bedeutet in dem Fall, dass eine Abweichung von ca. 2 nm zu verzeichnen war, die für die biosensorische Anwendung bereits erheblichen Einfluss darstellt. Für die Experimente im Späteren war daher der Umgang mit dem Immersionsöl, welches zur Verhinderung von ungewollter Lichtstreuung zwischen den Chromgitterchips und dem Objektträger (der unmittelbar auf dem Dunkelfeldkondensor liegt) dient, unter den Glassubstraten mit höchster Aufmerksamkeit bedacht, weil bereits geringe Mengen an Öl auf der Partikeloberfläche zu einer ungewollten Veränderung des Streuspektrums führen könnten und damit die Messung verworfen werden musste.

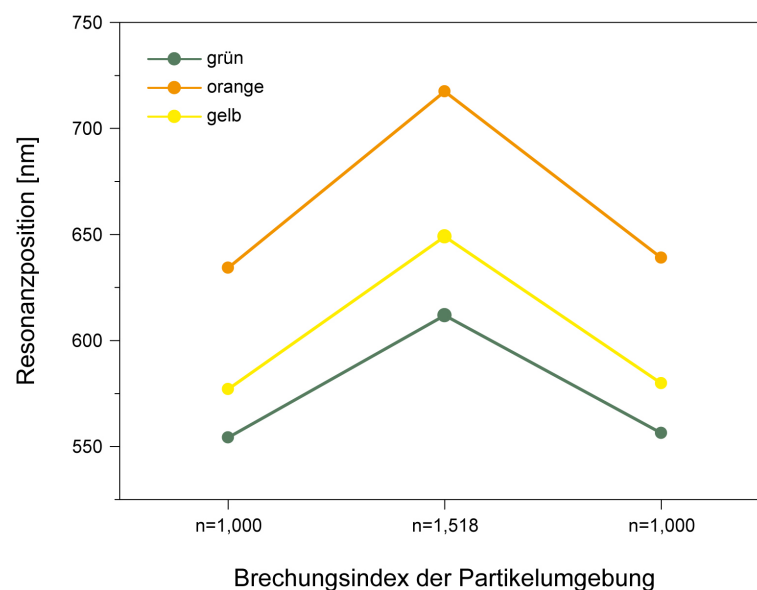


Abbildung 4.3: Resonanzänderung verschiedener Nanopartikel unterschiedlicher Größe nach Aufbringen von Immersionsöl sowie anschließender Reinigung. Die Streuspektren konnten nach einem Waschprozess mit anschließendem Plasmastricken mit einer Abweichung von ca. 2 nm wieder hergestellt werden.

4.1.4. Einfluss der x-y-z-Position des Nanopartikels im Messbereich

Der Einfluss der Fokussierung von Nanopartikeln während der Messung des Streuspektrums wird durch eine stufenweise Änderung der Fokusebene (z-Achse) untersucht. Zuerst wurde die Mikroskop-Abbildung auf das jeweils zu vermessende Partikel fokussiert und dessen Streuspektrum gemessen. Anschließend wurde die Höhe des Mikroskop-Objekttisches über die Mikroskop-Software in 500 nm-Schritten nach oben bzw. unten verstellt. Die Resonanzlage des nach jedem Schritt aufgenommenen Streuspektrums sowie die Abweichung des Streu-Peaks gegenüber dem Partikelspektrum aus der Fokusebene sind in Abbildung 4.4-A gezeigt. Je nach Änderung der z-Richtung verschiebt sich die Resonanzlage des Nanopartikels zu höheren oder niedrigeren Wellenlängen. Bedingt durch die Abhängigkeit der Resonanzposition von der Fokusebene, muss daher vor jeder Aufnahme des Partikelspektrums exakt auf den jeweils zu vermessenden Nanopartikel fokussiert werden.

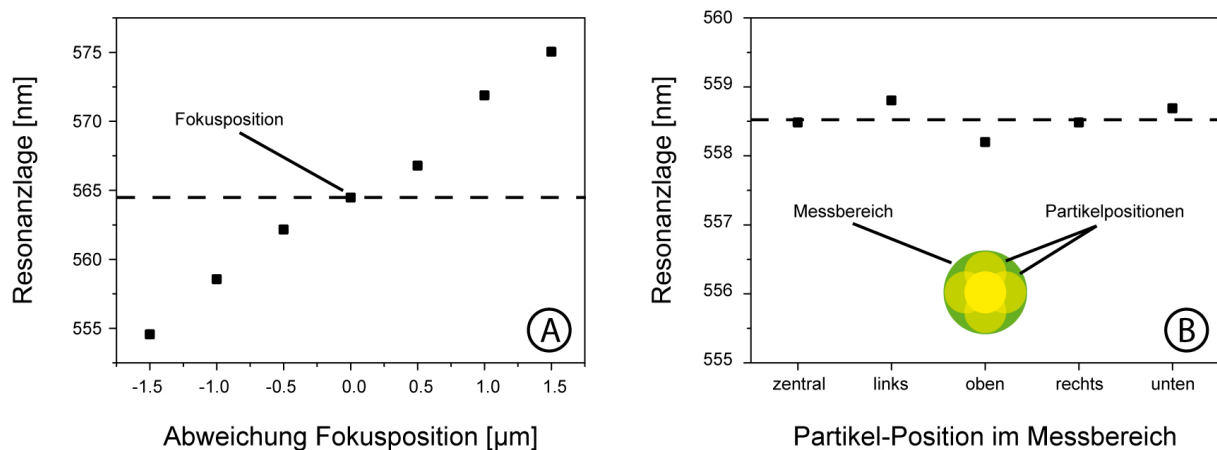


Abbildung 4.4: Abhängigkeit der Resonanzposition von der x-y-z-Orientierung des Streuquerschnitts der Nanopartikel. In (A) ist die Änderung der Resonanzlage in Abhängigkeit von der Fokusebene dargestellt. In (B) ist der Einfluss der Partikelpositionierung im Messbereich des Spektrometers dargestellt. Dabei wurde der Nanopartikel an 5 verschiedenen Stellen im Messfleck spektral vermessen, wobei lediglich eine geringe Abweichung von $\pm 0,2$ nm der Resonanzposition gegenüber der zentralen Ausrichtung des Partikels im Messbereich (Datenpunkt links) messbar war.

Zur genauen Vermessung der Streuspektren individueller Nanopartikel wurde die Abhängigkeit gegenüber der Lage im Messbereich (siehe Abschnitt 3.2.8.2.) bestimmt. Da dieser Bereich größer war als der Streuquerschnitt der vermessenen Nanopartikel, konnte deren Lage durch Verschieben der Probe verändert werden. Abbildung 4.4-B demonstriert die dadurch auftretende Änderung der maximalen Resonanzposition an einem exemplarischen Beispiel.

Dabei wurde eine mittlere Abweichung von lediglich $\pm 0,2$ nm gemessen. Da die Positionierung sehr genau durchgeführt werden konnte, war die genaue Zentrierung des Partikels problemlos einstellbar, so dass diese geringe Abweichung für die folgenden Messungen vernachlässigt werden konnte.

4.2. Vergleich der Streueigenschaften von plasmonischen Nanostrukturen

Die Streueigenschaften metallischer Nanopartikel sind von verschiedenen Faktoren abhängig und bestimmen maßgeblich die optischen Eigenschaften dieser Nanoteilchen sowie deren Sensitivität. Zur besseren Veranschaulichung wurden hierfür die Streuspektren individueller Nanopartikel mit unterschiedlichem Material, Größe und Form spektral vermessen (Abb. 4.5). Neben dem Streuspektrum eines sphärischen Goldnanopartikels wurden eine EBL-strukturierte Goldscheibe, eine Multi-Kern-Hülle Partikel (Gold-Kern mit dünner Silberhülle und aufgelagerter Goldhülle) [Knauer 2011] sowie ein Golddreiecksprisma untersucht. Die Nanopartikel zeigten jeweils eine deutlich Resonanz zwischen 500 und 650 nm, die sich in ihrer Lage und Intensität (hier zur besseren Darstellung auf das Maximum normiert) unterschieden. Neben der Änderung der Peakposition war auch das Auftreten weiterer Peaks zwischen 700 und 800 nm zu sehen. Diese zusätzlichen Resonanzen sind im Falle des Multi-Kern-Hülle-Partikels durch die unterschiedlichen Materialien bedingt, während besonders bei Dreiecksprismen die Kanten und Ecken dieser Nanostruktur für die ausgeprägten Resonanzen verantwortlich sind.

Die optischen Eigenschaften von metallischen Nanopartikeln kann man sich mit Hilfe von Berechnungen nach der Theorie von Gustav Mie verdeutlichen [Mie 1908]. Wichtig für die biosensorische Verwendung dieser Nanopartikel ist, dass die Streueigenschaften neben der Form, dem Material bzw. der Materialzusammensetzung sowie der Größe von einem weiteren Faktor abhängen: dem lokalen Brechungsindex des Umgebungsmediums. Um die zu erwartende Größenordnung der Resonanzänderung herauszufinden, wurde Resonanzposition für eine Goldkugel mit steigendem Durchmesser in zwei verschiedenen Umgebungsmedien (Luft und Wasser) berechnet. Der Kugeldurchmesser wurde dabei schrittweise um jeweils 1 nm von 40 auf 100 nm erhöht. In nachfolgender Abbildung 4.6 wurde der Brechungsindex von Luft mit $n = 1,00$ und von Wasser mit $n = 1,33$ angenommen.

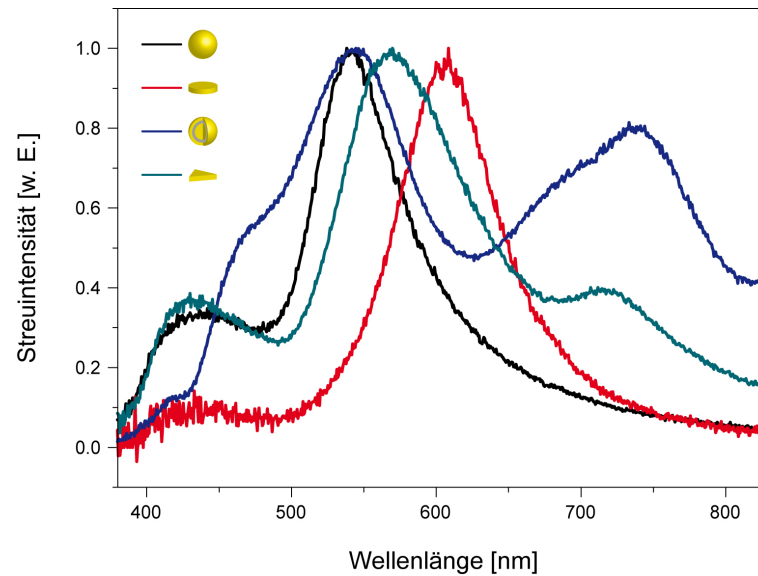


Abbildung 4.5: Streuspektren individueller Nanostrukturen. Die Intensität und Lage der Streumaxima ist dabei stark abhängig von der Form und dem Material bzw. der Materialzusammensetzung der verwendeten Partikel.

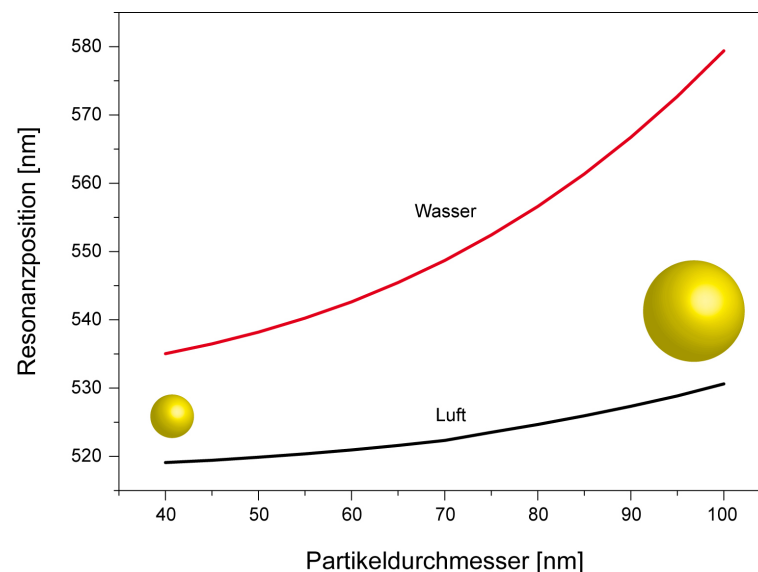


Abbildung 4.6: Mit Hilfe der Mie-Theorie ermittelte Änderung der maximalen Resonanzposition für Streuspektren von Goldnanopartikeln in Abhängigkeit ihres Durchmessers. Die Kalkulationen wurden für zwei verschiedene Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex ($n_{\text{Luft}} = 1,00$ und $n_{\text{Wasser}} = 1,33$) durchgeführt. Bei steigendem Partikeldurchmesser steht der geringen Resonanzänderung an Luft eine deutliche Verschiebung der Resonanzposition in flüssigem Medium gegenüber.

Es ist deutlich erkennbar, dass sich die Lage des Resonanzmaximums bei zunehmender Partikelgröße in den beiden Medien zu höheren Wellenlängen verschiebt. Außerdem ist zu erken-

nen, dass für eine Partikelgröße die Lage des Streupeaks bei steigendem Brechungsindex deutlich rotverschoben auftritt. Bei steigendem Partikeldurchmesser wird zudem der Unterschied in der Lage der Resonanzposition immer größer. Die hier berechneten Resonanzpositionen weichen allerdings teilweise deutlich von den experimentell ermittelten ab, die um 30-50 nm rotverschoben sind. Grund dafür ist die Tatsache, dass der Partikel sich nicht komplett in dem Umgebungsmedium befindet, da er auf einem Substrat angebunden ist. In der Literatur wurde dieser sogenannte Substrateffekt beschrieben [Lazarides 2000] und auch in verschiedene Kalkulationen über die Verwendung eines effektiven Brechungsindex berücksichtigt. Dabei wurde der Brechungsindex des verwendeten Glassubstrates prozentual dem Umgebungsmedium nach folgender Formel angerechnet:

$$n_{\text{eff}} = g \cdot n_{\text{matrix}} + (1 - g) \cdot n_{\text{substrat}} \quad (12)$$

mit n_{eff} als effektiver Brechungsindex, n_{matrix} als Brechungsindex des Umgebungsmediums, n_{substrat} als Brechungsindex des Glassubstrats und g als Gewichtungsfaktor. Im vorliegenden Fall waren n_{substrat} mit 1,47 und g mit 0,7 gegeben [Raschke 2005], woraus sich ein effektiver Brechungsindex von 1,14 ergab. Durch diese Anpassung der Berechnung der Streuspektren konnte in allen nachfolgenden Kalkulationen eine sehr genaue Übereinstimmung zwischen der Theorie und den experimentell ermittelten Spektren und Resonanzänderungen erreicht werden.

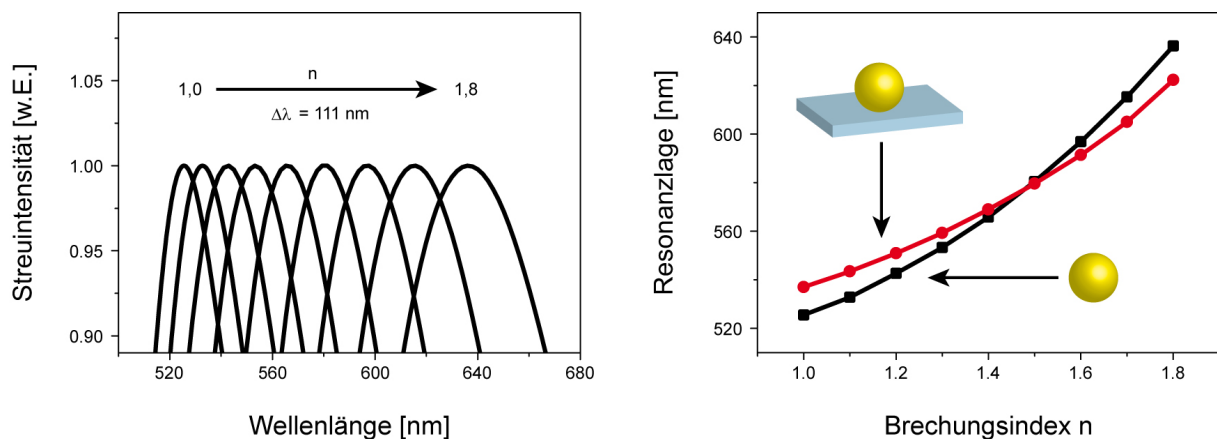


Abbildung 4.7: Änderung der Resonanzposition in Abhängigkeit vom Brechungsindex des Umgebungsmediums. Die linke Abbildung zeigt die Verschiebung des Streuspektrums zu höheren Wellenlängen bei steigendem Brechungsindex des Mediums. Rechts ist die Resonanzlage in Abhängigkeit vom Brechungsindex des Umgebungsmediums ohne (schwarz) und mit (rot) Einbeziehung des Glassubstrates dargestellt.

4.2.1. Spektrale Linienbreite

Neben der Verschiebung der maximalen Resonanzposition je Brechungsindexeinheit ist die spektrale Linienbreite ein wichtiger Faktor, um Aussagen über die Qualität von Nanopartikeln in Bezug auf deren Sensitivität gegenüber lokalen Brechungsindexänderungen zu treffen. Die spektrale Linienbreite ist dabei als Breite des Spektrums bei der Hälfte der Intensität des Streupeaks definiert. Nach der Prozessierung der Partikelspektren kann dieser Wert direkt aus den Parametern der verwendeten Fit-Kurve abgelesen werden (siehe Abschnitt 3.2.8.3.). Zur Ermittlung eines geeigneten (sensitiven) Transducer für die biosensorische Anwendung wurden die Resonanzpositionen sowie die zugehörige spektrale Linienbreite verschiedener Nanostrukturen untersucht (Abb. 4.8). Der Einfluss des Materials auf die spektrale Linienbreite wurde für den Fall von Gold- bzw. Silberdreiecksprismen gezeigt: bei nahezu gleicher Kantenlänge zeigten die Goldprismen eine schmalere Linienbreite als die Silberprismen. Während die über EBL hergestellten Nanostrukturen (Goldscheiben, Goldringe und Gold-Spaltringe) Linienbreiten zwischen 50 und 70 nm zeigten, lagen die Linienbreiten der chemisch synthetisierten Nanopartikel im Bereich von 20 bis 40 nm. Für die nachfolgenden Experimente wurde deswegen auf die Goldkugel, als Transducer mit einer besonders schmalen Linienbreite, zurückgegriffen.

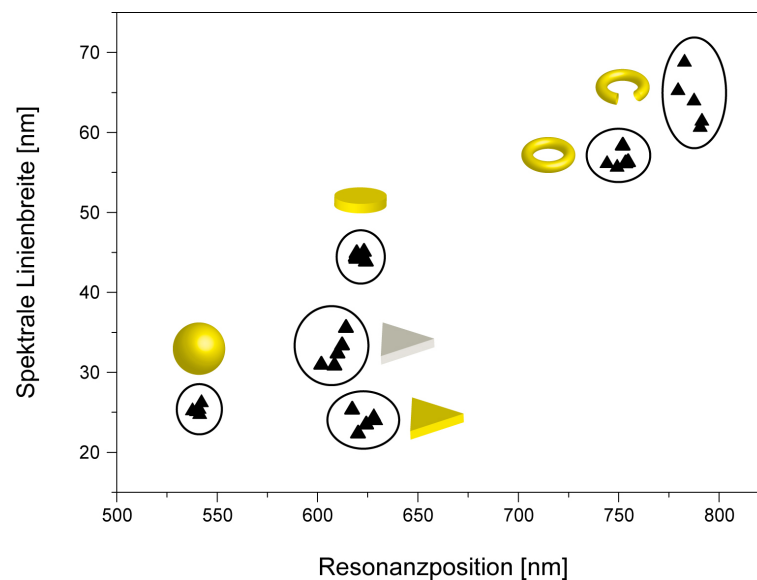


Abbildung 4.8: Resonanzposition und spektrale Linienbreite von Goldnanopartikeln mit unterschiedlicher Größe, Form und Material. Für sensorische Zwecke sind besonders schmale Linienbreiten bei hoher Verschiebung der Resonanzposition optimal.

4.3. Optimierung der Biofunktionalisierung des Transducers

Nach erfolgter Vorbereitung des Signalwandlers wurde mit der Funktionalisierung der Oberfläche begonnen. Dabei wurden entsprechende Erkennungselemente, wie Antikörper oder einzelsträngige DNA, über Physisorption und/oder Chemisorption an den Signalwandler bzw. eine Vermittlerschicht gebunden. Die Wahl des Erkennungselementes war dabei von dem nachzuweisenden Analyt bzw. von der jeweiligen Fragestellung des Experimentes abhängig. Durch die Funktionalisierung sollte eine Molekül-Schicht auf dem Transducer entstehen, welche eine Änderung des Brechungsindex zur Folge hat. Dadurch sollte vor dem sensorischen Schritt durch Bestimmung der LSPR eine Aussage über die Qualität bzw. Quantität des präparierten Sensors getroffen werden. Mit Kenntnis des Brechungsindex des Erkennungselementes, des umgebenden Mediums sowie der Dicke (Moleküldurchmesser bzw. -länge) der sensorisch aktiven Schicht, sollte die Mie-Theorie eine Aussage über den Bedeckungsgrad des Signalwandlers für eine gemessene Änderung der Resonanzposition der Plasmonenbande erlauben.

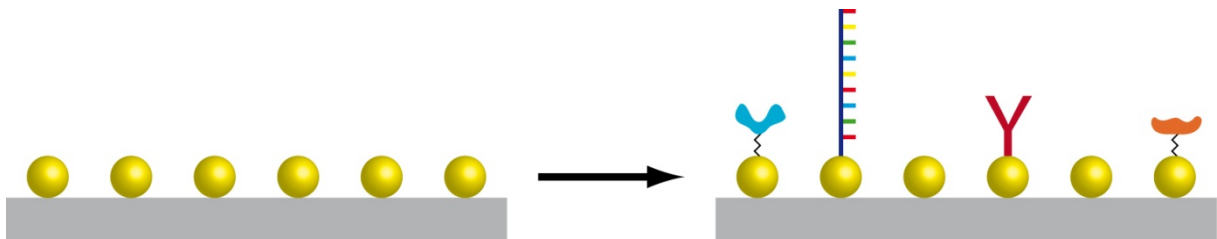


Abbildung 4.9: Funktionalisierung des Einzelpartikelsensors. Die Goldnanopartikel werden mit Erkennungselementen wie einzelsträngiger DNA, Antikörpern oder spezifischen Rezeptoren zur Detektion von Analytmolekülen funktionalisiert, wobei sie fest an die Partikeloberfläche gebunden werden.

4.3.1. Theoretische Betrachtung der Partikelfunktionalisierung

Die Auswirkung der Partikelfunktionalisierung auf das Streuspektrum wurde mit Hilfe der Mie-Theorie für Schalenpartikel für eine Goldnanokugel mit 80 nm Durchmesser durch eine schrittweise Erhöhung des Brechungsindex der Nanopartikelumgebung von $n_{\text{Matrix}} = 1,00$ um 0,1 berechnet (Abbildung 4.10). Mit zunehmendem Brechungsindex war erkennbar, dass sich die Resonanz zu niedrigeren Energien bzw. zu höheren Wellenlängen verschoben hat. Zudem war auffällig, dass gleichzeitig die spektrale Linienbreite der Resonanz abnahm. Die Resonanzverschiebung wurde in Abbildung 4.10-B gegen den Brechungsindex der Umgebung aufgetragen. Die mit der Mie-Theorie berechneten Werte wurden hier als schwarze Punkte

dargestellt. Durch einen linearen Fit dieser Werte konnte eine Resonanzverschiebung von 14 nm pro $\Delta n = 0,1$ ($1 \leq n \leq 1,8$) erhalten werden.

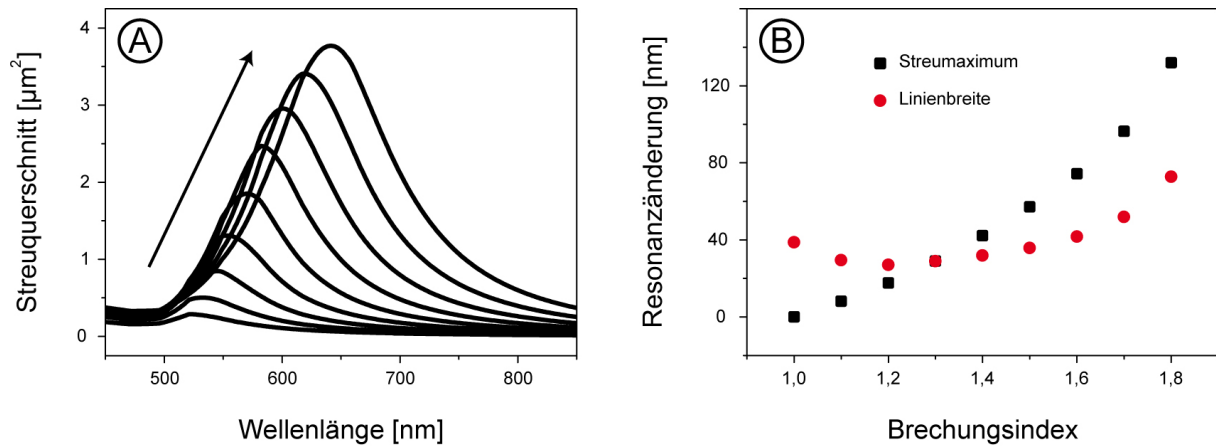


Abbildung 4.10: Mie-Kalkulation der Resonanzverschiebung nach Änderung des Brechungsindex des Umgebungsmediums. In (A) sind die kalkulierten Streuspektren eines 80 nm großen Goldnanopartikels bei steigendem Brechungsindex ($\Delta n = 0,1$) dargestellt. (B) zeigt die theoretische Resonanzverschiebung zu höheren Wellenlängen bei steigendem Brechungsindex des Partikelmediums. Die zugehörigen Linienbreiten sind als rote Punkte dargestellt.

Für die Realisierung eines Einzelpartikelsensors ergab sich aus den dargestellten Modellrechnungen: Eine einprozentige Erhöhung des Brechungsindex von $n = 1,33$ auf $n = 1,34$ bewirkte eine Resonanzverschiebung von etwa $\Delta\lambda = 1,4$ nm. In Anbetracht der hohen Messgenauigkeit, die in der Einzelpartikelspektroskopie erreicht wird, sind diese Unterschiede nicht zu vernachlässigen und können als verwertbare Signaländerungen gesehen werden. Brechungsindexänderungen in der genannten Größenordnung können beispielsweise durch die Zugabe der Analytlösung auf den Assay verursacht werden. Neben dem Einfluss von lokalen Brechungsindexänderungen sind auch Temperaturbedingte Änderungen der LSPR denkbar. Messungen zum Brechungsindex von Wasser (bei einer Wellenlänge von 589 nm) zeigten jedoch nach einem Temperaturanstieg von 20°C auf 30°C eine geringe Änderung von $\Delta n = 1,9 \cdot 10^{-3}$. Dementsprechend können Brechungsindexänderungen aufgrund von Temperaturschwankungen vernachlässigt werden [Raschke 2005].

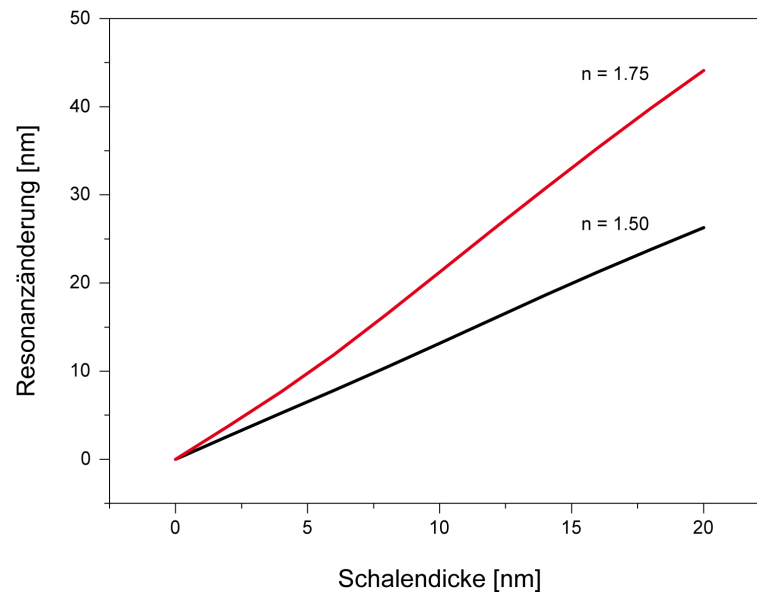


Abbildung 4.11: Verschiebung der Plasmonresonanzen von Goldkugeln (80 nm Durchmesser) bei Änderung der Schichtdicke. Die Resonanzänderung ist für zwei verschiedene Brechungsindizes berechnet worden. Ein höherer Brechungsindex der Partikelhülle bewirkt dabei eine stärkere Rotverschiebung des Resonanzpeaks.

Für Kalkulationen zur Anbindung von DNA-Molekülen mit der Mie-Theorie benötigt man den Brechungsindex dieser DNA-Schicht auf dem Nanopartikel. In der Literatur finden sich dazu abweichende Angaben, wobei ältere Publikationen meist von einem Brechungsindex von 1,7-1,8 ausgehen [Harrington 1970], während neuere Veröffentlichungen meist einen Brechungsindex ähnlich dem von Proteinen auf Oberflächen wählen ($n_{\text{Prot}} = 1,5$) [Maliwal 1995]. Um den Einfluss der Schalendicke auf die Änderung der Resonanzposition zu erhalten, wurde die Rotverschiebung für eine 80 nm Goldkugel mit steigender Schalendicke (0-20 nm) berechnet, wobei sowohl $n_{\text{Schale}} = 1,5$ und $n_{\text{Schale}} = 1,75$ für die DNA-Hülle angenommen wurde (Abbildung 4.11). Hier war deutlich die (erwartete) höhere Änderung der Resonanzbedingungen bei höherem Brechungsindex zu erkennen.

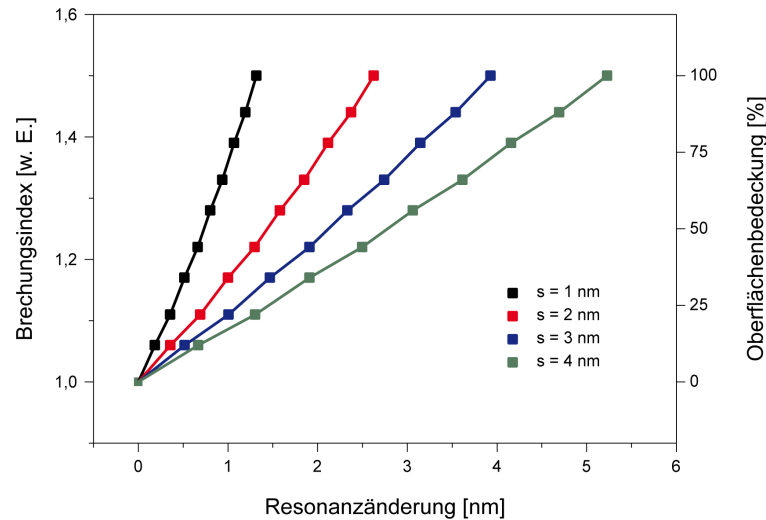


Abbildung 4.12: Die Rotverschiebung der Plasmonenbande kann neben Hinweisen zur Änderung des Brechungsindex auch eine Aussage über den Bedeckungsgrad des Nanopartikels geben, sofern der Brechungsindex der äußeren Schale sowie des umgebenden Mediums bekannt ist. Für vier verschiedene Schichtdicken (s) wurde die Brechungsindex- bzw. Bedeckungsänderung berechnet.

Allgemein gilt, dass bei Zunahme der Hüllendicke um einen Nanopartikel durch Aufbringen einer Biomolekülschicht eine stärkere Rotverschiebung des Streuspektrums zu erwarten ist. Um diese Aussage zu überprüfen, wurde eine Kalkulation für die 80 nm-Goldkugel für 4 verschiedene Schichtdicken bei einem Brechungsindex der biologischen Hülle von $n = 1,5$ kalkuliert (Abbildung 4.12). Gleichzeitig gab eine Rotverschiebung geringer als die theoretisch maximal berechnete Resonanzänderung einen Hinweis auf die Bedeckungsdichte der Partikeloberfläche mit Biomolekülen. Für die Auswertung der Experimente konnten somit Verluste während der Inkubations- bzw. Waschprozesse bestimmt und die Qualität des Experiments verfolgt werden.

Die Änderungen der Resonanzposition nach erfolgter Anbindung einer Biomolekülschicht hängt maßgeblich von der Schalendicke der Biomoleküle um den Nanopartikel sowie dem Brechungsindex dieser Hülle ab. Je nachdem, ob man sich in einem flüssigen Medium oder an Luft befindet, ändert sich die Plasmonresonanz stärker oder schwächer. Abbildung 4.13 zeigt die Rotverschiebung eines 80 nm Goldnanopartikels an Luft und in Wasser nach Anbindung einer Proteinhülle mit steigender Dicke von 0-100 nm. Deutlich sichtbar ist, dass bei steigender Schalendicke die Resonanzänderung an Luft größer ist als in einem flüssigen Medium. Zudem wird deutlich, dass die Empfindlichkeit gegenüber Brechungsindexänderungen ab einer bestimmten Distanz, die etwa doppelt so groß ist wie der Durchmesser des Na-

nopartikels, zur Oberfläche des Signalwandlers abnimmt. Die Änderung des lokalen Brechungsindex hat dann keinen signifikanten Einfluss mehr auf die Resonanzbedingungen des Partikels.

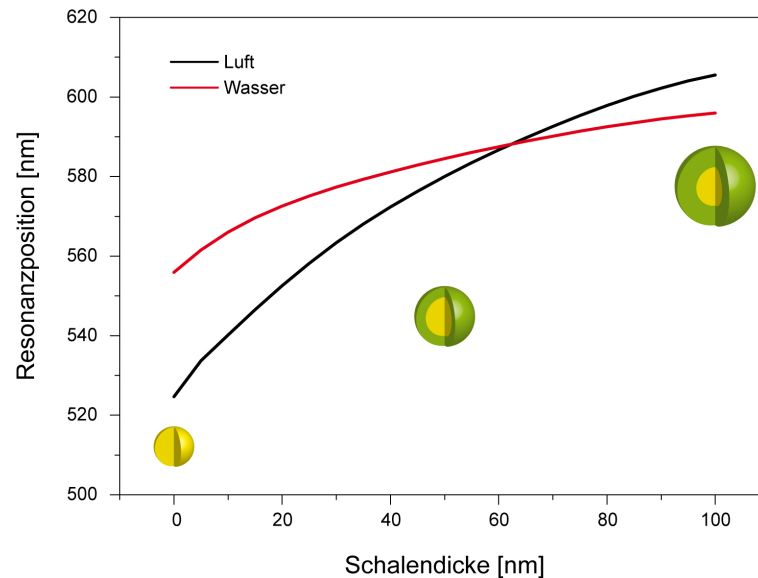


Abbildung 4.13: Die Änderung der Resonanzposition von Goldkugeln (80 nm Durchmesser) bei steigender Schalendicke ($n_{\text{Schale}} = 1,5$) in unterschiedlichen Medien ($n_{\text{Luft}} = 1,00$ und $n_{\text{Wasser}} = 1,33$) wurde mittels Mie-Theorie berechnet.

Dass die Resonanzposition auch von der Art der Hülle abhängig ist, zeigt Abbildung 4.14 anhand eines Modellvergleichs von Metall- und Proteinhülle. Hierfür wurde die Resonanzposition einer 80 nm Goldkugel für zwei verschiedene Medien (Luft und Wasser) berechnet. Anschließend wurde für das gleiche Nanopartikel die Resonanzposition bei Einbeziehung einer 10 nm dünnen Gold- bzw. Proteinhülle für beide Umgebungsmedien kalkuliert und die Änderung der LSPR-Position bestimmt. Während für die Goldhülle eine deutlich größere Resonanzänderung in flüssigem Medium zu erwarten war, verschob sich das Spektrum für die Goldkugel mit Proteinhülle an Luft mehr als in Wasser.

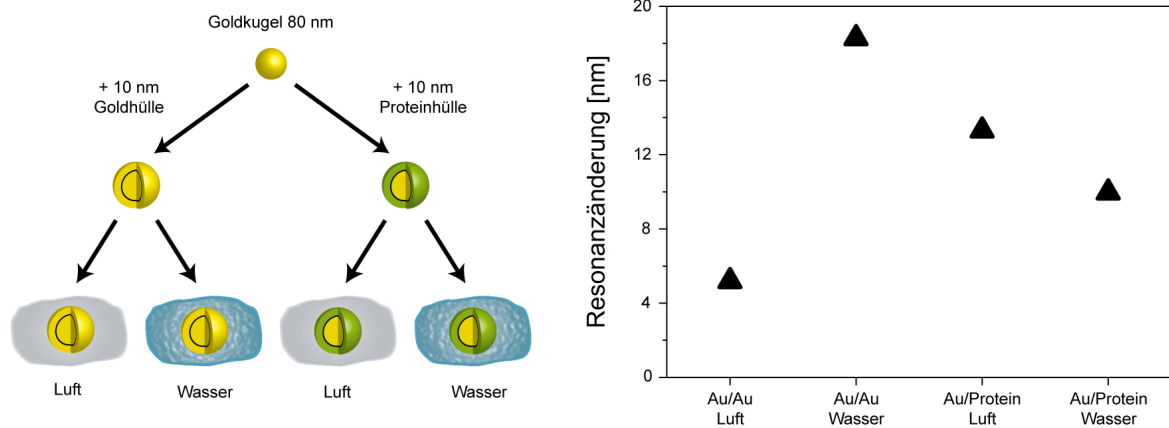


Abbildung 4.14 Mie-Kalkulation der relativen Resonanzverschiebung von 80 nm Goldkugeln mit einer 10 nm dicken Gold- bzw. Proteinhülle in verschiedenen Umgebungsmedien (Luft und Wasser). Während die Goldhülle einen kleinen Effekt an Luft (links) zeigt, ist die Resonanzverschiebung in wässrigem Medium am größten (2. von links). Besteht die Schale um den Partikel aus biologischem Material (hier: Protein; $n = 1,5$), so ist die Veränderung der Resonanzposition an Luft (3. von links) größer als in Wasser (rechts).

4.3.2. Funktionalisierung von Nanopartikeln mit einzelsträngiger Fänger-DNA

Die Funktionalisierung der Partikel mit Fänger-DNA ist ein wichtiger Schritt vor dem Nachweis des Ziel-DNA-Stranges. Hier werden die Weichen dafür gestellt, wie effizient die Hybridisierung als der eigentliche sensorische Schritt erfolgen kann. Neben einer hohen Bedeckungsdichte der Fänger-DNA ist deren leichte Zugänglichkeit nötig, um möglichst vielen Analyt-Moleküle die Ausbildung von Basenpaarungen mit der partikelgebundenen ssDNA zu ermöglichen. Im Rahmen der SPR-Spektrometrie wurden auf planaren Goldsubstraten verschiedene Methoden zur Erhöhung der Hybridisierungseffizienz getestet, welche in diesem Abschnitt erstmals auch für die Einzelpartikelsensorik angewandt werden sollen.

Um die Fänger-DNA zunächst auf die Goldoberfläche zu bringen, wurden kommerzielle Oligonukleotide mit einer Thiol-Gruppe verwendet, welche über einen C_6 -Abstandshalter (6 (CH_2) -Gruppen) an das 5'-Ende gebunden ist. Die Thiol-Gruppe ist dabei kovalent an die Goldatome des Nanopartikels gebunden [Häkkinen 2012]. Nach erfolgter Immobilisierung dieser DNA ragt der DNA-Einzelstrang nicht zwingend frei in den Raum, sondern kann sich auch über die stickstoffhaltigen Nukleobasen auf der Goldoberfläche anlagern, wodurch der Zugang für die Ziel-DNA erschwert würde. Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems kam 1997 von Herne bzw. 1998 von Levicky. Sie beschrieben, wie die Inkubation von 6-Mercaptohexanol (MCH) nach erfolgter DNA-Immobilisierung die Oberfläche aufgrund ihrer

OH-Gruppen passiviert und somit die unerwünschte Anlagerung der DNA-Basen verhindert [Herne 1997, Levicky 1998]. Zusätzlich wurde eine weitere wichtige Eigenschaft der Ko-Adsorption von MCH demonstriert: die Hybridisierung von oberflächengebundener DNA ist stark vom Abstand der DNA-Einzelstränge (und damit der Oberflächenbedeckung) abhängig. Das MCH auf der Oberfläche wirkt auch als Abstandshalter zwischen den gebundenen DNA-Strängen, wodurch die Konkurrenz der Ziel-DNA um Bindestellen auf der Oberfläche minimiert wird. Zusätzlich wird durch diesen 2-Schritt-Prozess die unspezifische Adsorption der DNA-Stränge an der Goldoberfläche minimiert. Somit ist die Mehrzahl der Fänger-DNA-Moleküle für die spezifische Hybridisierung mit komplementärer DNA zugänglich [Herne 1997, Levicky 1998, Steel 2000].

Einen weiteren Ansatz zur Verbesserung der Hybridisierungseffizienz um 44 % wurde von Demers im Jahr 2000 beschrieben. Diese Steigerung basierte auf der Verwendung von kurzen Oligonukleotidsequenzen als Abstandshalter zwischen Erkennungssequenz und der Substratoberfläche, wobei sich eine Sequenz aus mehreren Adenin-Basen, einem sogenannten poly-A-Spacer, als besonders effizient gezeigt hat [Demers 2000].

Neben dem Einsatz von Abstandshaltermolekülen (MCH) zwischen den oberflächengebundenen DNA-Strängen und der Verwendung von poly-A-Sequenzen kann man zusätzlich noch die Anbindung der Fänger-DNA verbessern, indem man die Thiol-Gruppe durch ein Reduktionsmittel „aktiviert“. Dabei stehen beispielsweise Dithiothreitol (DTT) oder Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) zur Verfügung, welche Disulfidbrücken zwischen den thiol-modifizierten Oligonukleotiden untereinander auflösen. Diese Disulfide behindern die Anbindung der DNA, da deren Thiol-Gruppen nicht mehr so effektiv mit der Goldoberfläche reagieren und damit den DNA-Strang anbinden können [Getz 1999].

Mit Hilfe der Mikrospektroskopie wurden diese verschiedenen Ansätze zur Verbesserung der Hybridisierungseffizienz hinsichtlich ihres Einflusses auf die Resonanzänderung untersucht. Dabei sollte zunächst überprüft werden, wie sich die Resonanzposition des Partikelspektrums nach Anbindung der Fänger-DNA verändert hat. Neben dem Einfluss der Thiol-Gruppe auf die Anbindung (DNA mit und ohne SH-Gruppe) wurde die Ko-Inkubation mit MCH, die Verwendung des poly-A-Spacers sowie der zusätzliche Reduzierungsschritt zum Aufspalten der eventuell vorhandenen Disulfidbrücken untersucht. In Abbildung 4.15 ist die Resonanzverschiebung als Box-Plot für jeden einzelnen Ansatz dargestellt, wobei die resultierende Resonanzposition nach $\Delta\lambda = \lambda_{\text{Fänger}} - \lambda_{\text{Partikel}}$ bestimmt wurde. Im Experiment wurden dazu jeweils 25-50 individuelle Goldnanopartikel vermessen und geplottet.

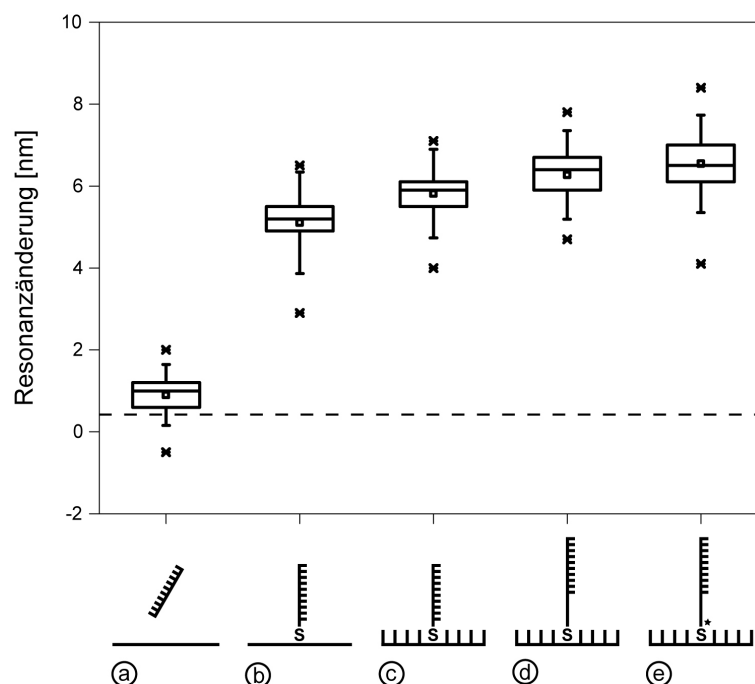


Abbildung 4.15: Einfluss der Immobilisierungsbedingungen auf das LSPR-Signal. Die gestrichelte Linie gibt das Signal des unmodifizierten Nanopartikels nach Inkubation mit Immobilisierungspuffer ohne DNA an. Die Experimente beinhalten (a) DNA ohne Thiol-Gruppe, (b) DNA mit Thiol-Gruppe, (c) Thiol-DNA und MCH in einer gemischten Monolage, (d) die gemischte Monolage und DNA mit einem zusätzlichen poly-Adenin-Abstandshalter, und (e) die zuletzt genannte Kombination mit voraktivierter Thiol-Gruppe durch TCEP (siehe Text).

Bringt man einen DNA-Strang ohne Thiol-Gruppe auf die Goldpartikel auf, so ist lediglich eine geringe Änderung der Plasmonresonanz von ca. 1 nm zu erkennen (was auf eine unspezifische Anlagerung der DNA an die Goldoberfläche hindeutet), während man mit Thiol-Gruppe bereits eine Änderung von 5,1 nm erreicht. Unter Zuhilfenahme von MCH lässt sich eine schwache Zunahme des Signals 5,8 nm detektieren, der poly-A-Abstandshalter (6,2 nm) sowie die Aktivierung der Thiol-Gruppe mit TCEP (6,5 nm) verschieben das Streumaximum jeweils zusätzlich um etwa 0,4 nm bzw. 0,3 nm.

4.4. Bioanalytische Anwendung

Nach erfolgter Funktionalisierung der metallischen Nanopartikel sollte der bioanalytische Nachweis einzelsträngiger DNA erreicht werden. Mit einem Überschuss an Ziel-DNA wurde zunächst die Größenordnung der zu erwartenden Signaländerung bestimmt. Anschließend wurden verschiedene Funktionalisierungsstrategien hinsichtlich einer Steigerung der Hybridi-

sierungseffizienz getestet. Das Detektionslimit für den Nachweis der DNA-Hybridisierung wurde durch die schrittweise Verringerung der Analyt-Konzentration bestimmt. Im Anschluss wird eine Methode zur Verstärkung des LSPR-Signals über die zusätzliche Anbindung eines Streptavidin-Nanopartikel-Konjugates an die gebundene Analyt-DNA geprüft. Die Spezifität der Mikrospektroskopie bezüglich der Detektion von Brechungsindexänderungen durch Anbindung von DNA-Molekülen und der damit verbundenen Schichtdickenzunahme auf der Partikeloberfläche konnte durch ein DNA-Sandwich-System, welches aus 3 einzelsträngigen DNA-Molekülen bestand, gezeigt werden. Als *Proof-of-Principle*-System für die Proteinanalytik wurde abschließend die Detektion von BSA durch einen BSA-bindenden Antikörper untersucht und die ermittelten Messwerte mit den theoretisch berechneten Daten verglichen.

4.4.1. Qualitativer Nachweis von DNA

Der in den vorangegangenen Abschnitten präparierte Sensor wurde mit dem nachzuweisenden Analytmolekül inkubiert. Die Probenlösung mit der Ziel-DNA wurde auf das vorbereitete Substrat gegeben und bei der für die nachzuweisende DNA-Sequenz spezifischen Hybridisierungstemperatur inkubiert. Die verwendete DNA wurde im Überschuss ($c = 1 \mu\text{mol/l}$) zugegeben, um die Anzahl der DNA-Moleküle als begrenzenden Faktor für die Anbindung ausschließen zu können. Nach anschließenden Waschprozessen zum Entfernen nichtgebundener bzw. unspezifisch gebundener DNA wurde das Streuspektrum des Nanosensors gemessen und die Anbindung der Ziel-DNA über die Verschiebung des Resonanzmaximums $\Delta\lambda = \lambda_{\text{Analyt}} - \lambda_{\text{Fänger}}$ detektiert. Ein repräsentatives Beispiel für einen solchen DNA-Nachweis ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Hier wurde eine 80 nm Goldkugel mit Fänger-DNA funktionalisiert und danach in einer Lösung mit Analyt-DNA (U3c) inkubiert. Vor und nach jedem Schritt wurde das Streuspektrum gemessen, um die lokalen Brechungsindexänderungen durch die DNA-Anbindung zu detektieren. Sowohl das Aufbringen der Erkennungsschicht (Fänger-DNA), als auch der Analytschicht führen jeweils zu einer Erhöhung der Streuintensität und einer Verschiebung des Resonanzmaximums zu höheren Wellenlängen. Dabei war die zu verzeichnende Änderung nach dem ersten Schritt größer (ca. 7 nm), als nach dem sensorisch relevanten zweiten Schritt (4 nm).

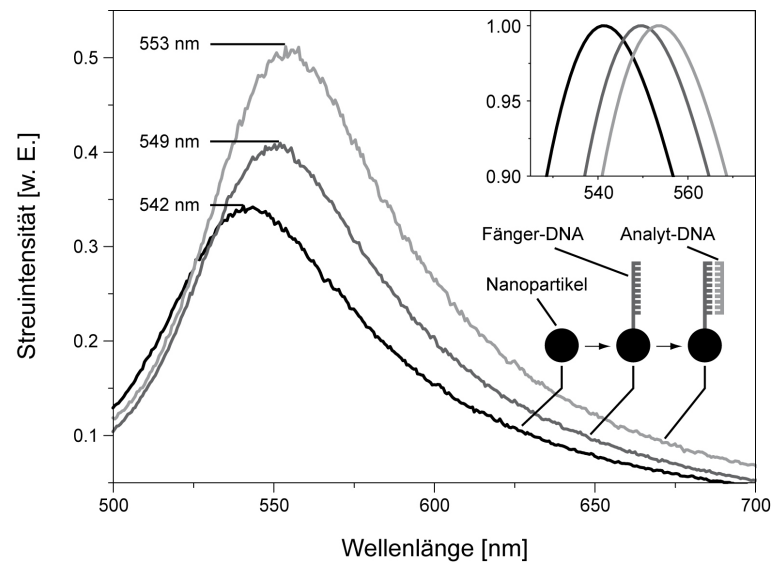


Abbildung 4.16: Streuspektren einer 80 nm Goldkugel. Die schrittweise Präparation des Sensors sowie der folgende analytische Schritt können durch die jeweilige Rotverschiebung der Plasmonresonanz und dem Anstieg der Streuintensität direkt verfolgt werden (siehe Text für detaillierte Beschreibung).

Im vorangegangenen Abschnitt (Funktionalisierung von Nanopartikeln mit einzelsträngiger DNA) wurden Methoden beschrieben, die zu einer Steigerung des Signals (größere Rotverschiebung) nach der Hybridisierung führen sollen. Dabei wurde zum einen die Fänger-DNA auf der Oberfläche mit MCH verdünnt, zum anderen die Fänger-DNA durch einen Abstandshalter (poly-A-Spacer) von der Oberfläche entfernt, oder die Thiol-Gruppe aktiviert. Diese Varianten der Beschichtung wurden nun hinsichtlich ihres Effektes auf die Signaländerungen bei der Hybridisierung geprüft. In Abbildung 4.17 sind die Resonanzänderungen der Nanopartikel nach Hybridisierung der Ziel-DNA, in Abhängigkeit von den Immobilisierungsbedingungen, aufgetragen. Als Referenz wurden Messungen nach Inkubation mit Hybridisierungspuffer (2 x SSC; gestrichelte Linie) und mit nicht-komplementärer DNA verwendet (a). Der Unterschied zwischen einer Ko-Adsorption von MCH (c) und ohne MCH (b) war nicht detektierbar, da beide eine Rotverschiebung von etwa 2 nm aufzeigten. Lediglich der Abstandshalter in dem DNA-Strang (d), durch mehrere aufeinanderfolgende Adenin-Basen, konnte eine weitere Änderung der Resonanzposition um ca. 0,6 nm bewirken. Die Aktivierung der Thiol-Gruppe (e) hatte dagegen keinen Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz, es war keine weitere Rotverschiebung erkennbar.

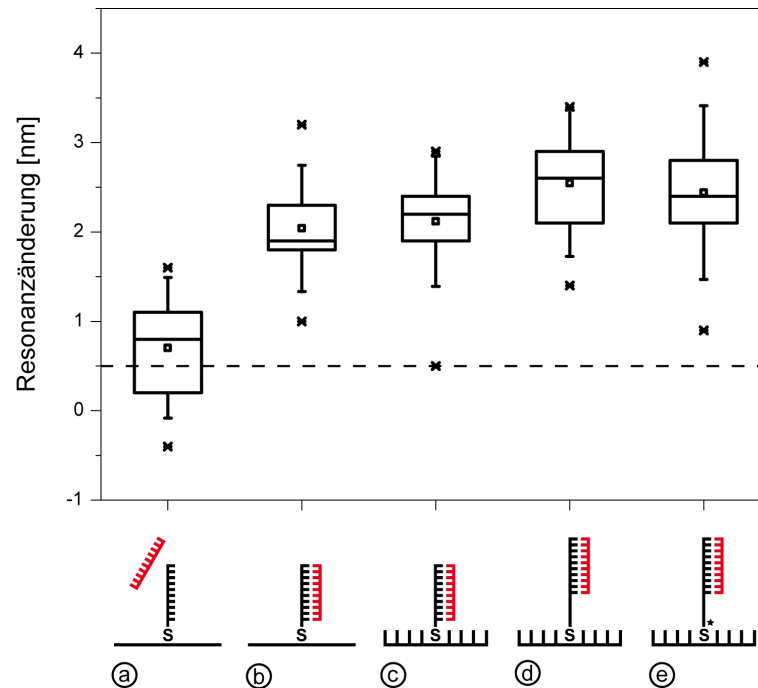


Abbildung 4.17: Resonanzverschiebung nach Anbindung der Analyt-DNA nach verschiedenen Immobilisierungsbedingungen. Die gestrichelte Linie gibt das Signal für Puffer allein an. In (a) sind die Fänger-DNA und die nicht-komplementäre Analyt-DNA als Negativkontrolle dargestellt. In (b)-(e) wurde jeweils komplementäre DNA an die Fänger-DNA hybridisiert, dabei in (b) an Fänger-DNA mit Thiol-Gruppe, in (c) an thiol-DNA und MCH in einer gemischten Monolage, in (d) an eine derartige gemischte Monolage mit Fänger-DNA, die einen zusätzlichen poly-Adenin-Abstandshalter besitzt, und in (e) an die zuletzt genannte Kombination mit durch TCEP voraktivierter Thiol-Gruppe (siehe auch Abschnitt Material/Methoden).

4.4.2. Quantitativer Nachweis von DNA

Neben dem qualitativen Nachweis von hybridisierter einzelsträngiger DNA sollte im folgenden Abschnitt die Empfindlichkeitsgrenze des Sensors bezüglich der Menge an eingesetzter Analyt-DNA untersucht werden. Hierzu wurden DNA-Konzentrationen in einem Bereich von 10 μM bis 10 pM untersucht. Um eine bestmögliche Hybridisierungseffizienz zu erreichen, wurde die Sensorschicht für alle folgenden Messungen mit MCH inkubiert und die Fänger-DNA mit poly-A-Spacers verwendet. In Abbildung 4.18 sind die Werte für jeweils 25 individuelle Goldkugeln dargestellt, wobei die Konzentration der Analyt-DNA ausgehend von 10 μM um jeweils eine Zehnerpotenz herabgesetzt wurde. Im Bereich von 1 μM und 10 μM konnte eine ähnliche Rotverschiebung nach Anbindung der DNA von etwa 2,6 nm gemessen werden. Nach weiterer Abnahme der DNA-Konzentration ist ein Signalabfall zu verzeichnen.

Im Bereich von 100 nM bis 10 nM sinkt die Verschiebung der Plasmonresonanz bis auf 1,5 nm. Bei dem Einsatz geringerer DNA-Konzentrationen konnten kein Unterschied mehr zum Einsatz von nicht-komplementärer DNA (0,4 nm Verschiebung; gestrichelte Linie) festgestellt werden, womit die Nachweisgrenze von einzelsträngiger komplementärer DNA für dieses System bei 10 nM ermittelt wurde.

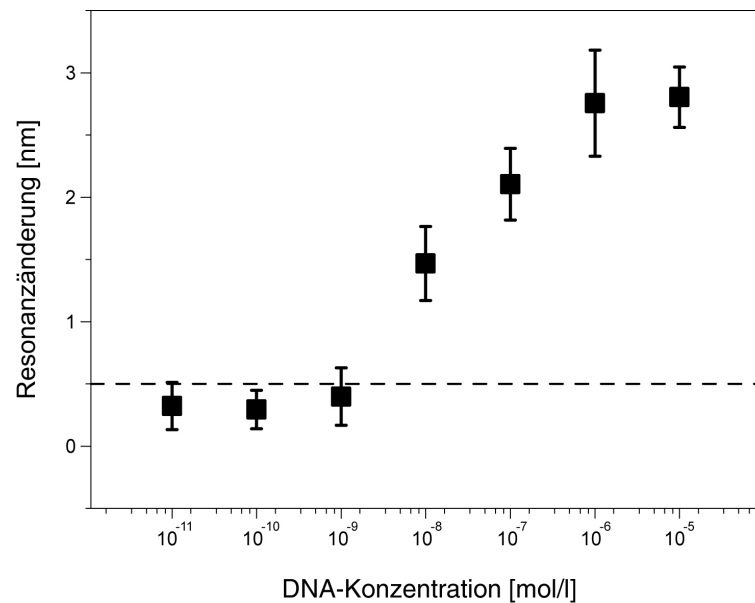


Abbildung 4.18: Abhängigkeit des Sensorsignals von der Konzentration der Analyt-DNA. Die Sättigung der Oberfläche ist ab Konzentrationen höher als 1 μ M zu beobachten, während die Nachweisgrenze bei 10 nM DNA liegt. Als Kontrolle diente nicht-komplementäre DNA (1 μ M, gestrichelte Linie).

4.4.3. Verstärkung des Sensorsignals

Das Detektionslimit für den Nachweis der Analyt-DNA wurde im vorherigen Abschnitt ermittelt. Da in einer Probenlösung (beispielsweise Zellextrakt) durchaus geringere Konzentrationen an DNA-Molekülen vorliegen können (in den Versuchen wurde mit $[c] = 1 \mu\text{mol/l}$ immer ein Überschuss an DNA eingesetzt), wurde nach einer Möglichkeit gesucht, das Signal für die Hybridisierung zu verstärken. Hierfür wurde ein Ansatz gewählt, der bereits in der Literatur gut bekannt ist: die sehr hohe Affinität von Biotin-Molekülen zu dem bakteriellen Protein Streptavidin. Durch die weitere Brechungsindexänderung, bei gleichzeitiger deutlicher Zunahme der Schichtdicke an Biomolekülen auf der Partikeloberfläche, sollte das LSPR-Signal durch die Anbindung von Streptavidin-Goldnanopartikel-Konjugaten (SA-Gold) über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung verstärkt werden.

Um eine größere Verschiebung der Plasmonresonanz bei geringen Mengen an DNA-Strängen zu erhalten, muss der lokale Brechungsindex erhöht werden, sobald Analyt-DNA an die Fänger-DNA gebunden hat. Einen Ansatz stellt dabei die Biotinylierung der nachzuweisenden DNA dar. Hat die Hybridisierung erfolgreich stattgefunden, kann dann in einem weiteren Schritt SA-Gold hinzugegeben werden, welches durch die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin direkt an die hybridisierten DNA-Moleküle bindet. Der zusätzlich gebundene Goldnanopartikel bewirkt eine größere Verschiebung der Plasmonresonanz als die hybridisierten DNA-Moleküle. Dadurch können bereits geringere Konzentrationen an Ziel-DNA, nach Anbindung von SA-Gold, eine größere Änderung im Streuspektrum bewirken.

Im Experiment wurden Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 20 nm, welche mit Streptavidin-Molekülen funktionalisiert waren, für die Signalverstärkung eingesetzt. Zunächst wurde die DNA, zum Vergleich mit den Ergebnissen aus Abschnitt 2, mit einer Konzentration von 1 μM eingesetzt. Abbildung 4.19 zeigt die resultierenden Änderungen der Plasmonresonanz nach der Anbindung von SA-Gold. Als Positivkontrolle wurde bereits die Fänger-DNA mit Biotin modifiziert, als Negativkontrolle wurden entweder nur die Pufferlösung (1 x PBS) oder Goldnanopartikel ohne Streptavidin-Umhüllung verwendet. Zusätzlich wurde in einem Versuch die Hybridisierung von Fänger- und Ziel-DNA bereits vor der Immobilisierung auf dem Chip durchgeführt, um eventuelle Signalverluste der on-Chip-Hybridisierung nachzuweisen. Die Positivkontrollen zeigen die erwartete höhere Verschiebung durch das Weglassen des Hybridisierungsschrittes, während die Negativkontrolle mit 1 x PBS keine Änderung der Resonanzbedingungen zur Folge hat. Während die einfache Hybridisierung eine Rotverschiebung von ca. 2,6 nm zur Folge hatte (siehe Abbildung 4.17-d), konnte nach der SA-Gold-Anbindung eine weitere Verschiebung von etwa 3 nm detektiert werden (c). Somit konnte durch diese Modifikation der Methode eine klare Sensitivitätssteigerung erreicht werden.

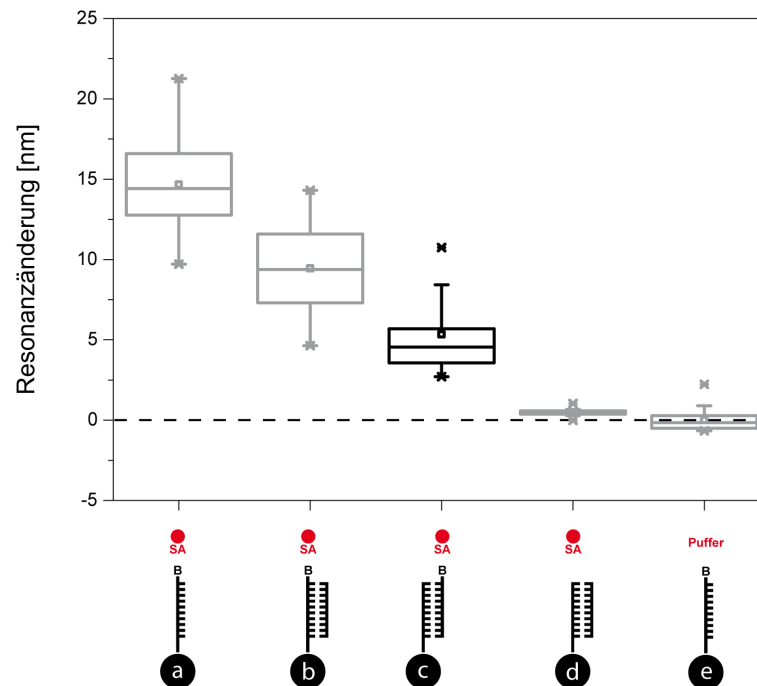


Abbildung 4.19: Verstärkung des Hybridisierungssignals durch Anbindung von Goldnanopartikel an DNA mittels Biotin-Streptavidin-Bindung. Die Positivkontrolle (a) zeigt das Signal nach Anbindung von SA-Gold an die Biotin-markierte Fänger-DNA. In (b) und (c) wurde die Analyt-DNA an den Fänger hybridisiert, wobei jeweils die Fänger-DNA (c) und die Analyt-DNA Biotin-markiert wurde. Die Inkubation der DNA-Probe ohne Biotin-Markierung mit SA-Gold (d) und die Inkubation von Biotin-markierter-DNA mit Puffer-Lösung (e) wurde als Negativkontrolle verwendet.

4.4.4. DNA-Sandwich-System

Ein übliches Bindungsprinzip für Analytmoleküle bei Biochips und Sensoren stellt die Verwendung eines DNA-Sandwich-Systems dar. Die Anwendbarkeit der Mikrospektroskopie für den Nachweis von Hybridisierungsereignissen und die Abstandsabhängigkeit sollte durch den Einsatz dieses Systems geprüft werden. Hierbei wurde nicht nur ein erster, sondern auch ein zweiter Hybridisierungsschritt experimentell nachgewiesen werden. Das DNA-Sandwich-System bestand dabei aus einem Fänger-Oligonukleotid von 20 Basen, das auf der Partikeloberfläche immobilisiert wurde. Eine sogenannte Linker-DNA mit einer Länge von 46 Basen wurde im ersten Schritt an den Fänger hybridisiert (vergl. 4.20-e). Im zweiten Schritt wurde wiederum ein kurzes und entsprechend komplementäres DNA-Molekül (Fill) von 20 Basen an den zweiten Teil des Linkers hybridisiert (vergl. 4.20-d). Zusätzlich wurden einzelne Abschnitte des Sandwich-Systems vor der Anbindung auf dem Goldpartikel hybridisiert, um auch hier den Vergleich zwischen den Hybridisierungsschritten in Lösung und auf dem Chip

(und damit auf dem Nanopartikel) zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.20 dargestellt.

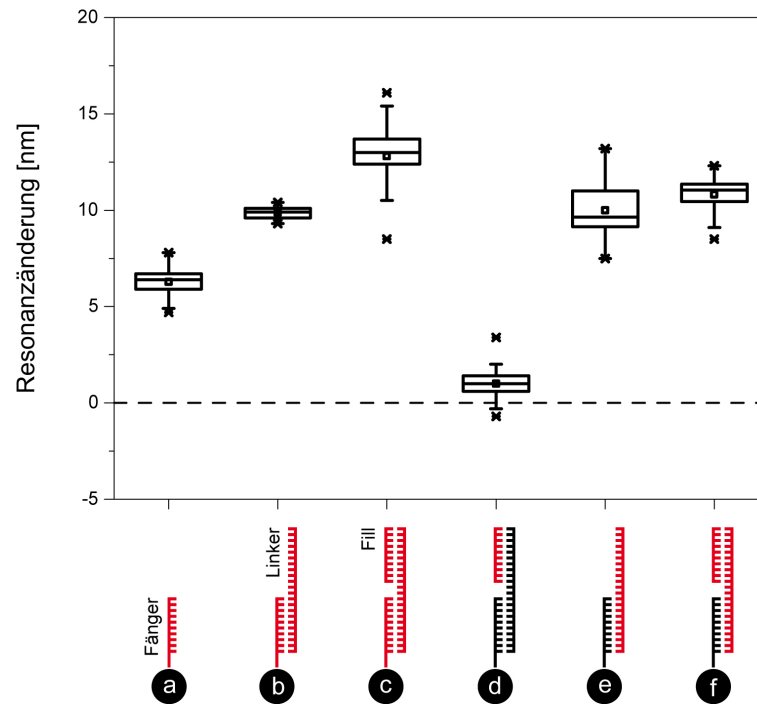


Abbildung 4.20: Untersuchung einzelner Hybridisierungsschritte an einem DNA Sandwich-System. Dargestellt ist die Resonanzverschiebung des Partikelspektrums nach Modifizierung mit DNA. Der Zustand vor der Modifizierung ist unter dem Diagramm schwarz gekennzeichnet. Der Zustand nach der Immobilisierung bzw. Hybridisierung von DNA auf dem Partikel ist rot dargestellt.

Die Änderung nach Anbindung der Fänger-DNA (a) entspricht dem gleichen Resultat wie in Abbildung 4.15-d. Eine deutlich größere Rotverschiebung des Streuspektrums ist nach der Hybridisierung des Linker-Moleküls zu verzeichnen (b), während sich nach der Anbindung von Fill (c) eine geringere Verschiebung von 1 nm nachweisen lässt. Die Gesamtverschiebung von Fänger, Linker und Fill ergibt nach Addition der einzelnen Resonanzänderungen etwa 17 nm. Vergleichend dazu kann man die einzelnen Komponenten des DNA-Sandwich-Systems erst hybridisieren und anschließend auf dem Nanopartikel aufbringen (f). Die Änderung hier beträgt 13 nm und ist damit geringer als nach den einzelnen Hybridisierungsschritten. Wiederum ergeben Linker und Fill zusammen eine Verschiebung von 11 nm (e), während Fänger und Linker (d) addiert etwa 10 nm Verschiebung zeigen.

Die Abhängigkeit der Resonanzänderung von der Masse der angebundenen DNA-Stränge und deren Abstand zur Sensoroberfläche lässt sich auch über eine Beziehung zum Molekulargewicht darstellen. Für jeden DNA-Strang kann das Molekulargewicht ermittelt

werden, da die atomare Masse von Nukleotiden eines DNA-Stranges durchschnittlich 330 Da beträgt. Die Ergebnisse in Abbildung 4.21 belegen dabei deutlich, dass eine Abhängigkeit von angebundener Molekülmasse und Änderung der Resonanzposition vorhanden ist. Im Bereich bis 15 kDa kann dabei eine große Signaländerung zu sehen, während die Resonanzänderung ab 15 kDa kleiner wird. Der Einfluss des Signals auf die Entfernung des angehenden DNA-Stranges von der Partikeloberfläche kann hier ebenfalls verdeutlicht werden (siehe Datenpunkte bei 7 kDa). Beide angehenden DNA-Stränge haben das gleiche Molekulargewicht, der einzige Unterschied liegt jedoch in der Entfernung zur Sensoroberfläche, die durch die Fänger-DNA bestimmt wird. Während der Strang mit geringerer Entfernung zur Oberfläche eine Resonanzverschiebung von 2,6 nm zeigt, liegt die Änderung bei größerer Entfernung nur noch bei 1 nm.

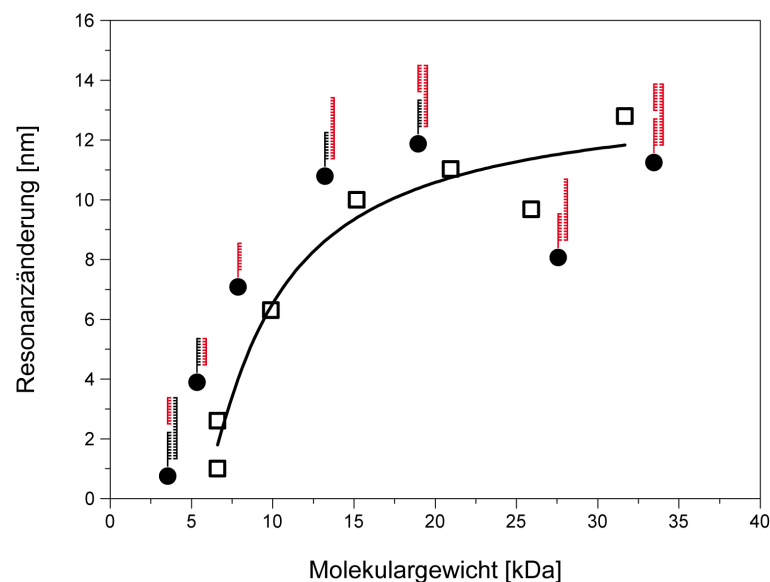


Abbildung 4.21: Das Molekulargewicht der jeweils angehenden DNA und die resultierende Änderung der Resonanzlage. Deutlich ist die Zunahme des LSPR-Signals bei steigendem Molekulargewicht zu erkennen. Ab 15 kDa ist die Signaländerung bei zunehmendem Gewicht der DNA deutlich geringer als unter 15 kDa.

4.4.5. Nachweis von *Phytophthora*-Arten - Biologische Applikation

Das sensorische Potential metallischer Nanopartikel für die DNA-Analytik und deren praktische Anwendbarkeit sollte in diesem Abschnitt anhand der Identifizierung von Bakterienarten der Gattung *Phytophthora* geprüft werden. Als Untersuchungsobjekte dienten DNA-Sequenzen der Arten *Phytophthora kernoviae* und *Phytophthora ramorum*. Diese, der Klasse der Eipilze (*Pernosporemycetes*) [Dick 2001] zugehörigen, Pflanzenpathogene kommen als

Parasiten oder Saprophyten vor und sind je nach Art bei Befall der Pflanzen für die charakteristische Blattfärbung, die Färbung der Rinde, das Absterben der Triebe und der Wurzelfäule verantwortlich. Da die *Phytophthora*-Arten neben zahlreichen Wildpflanzen auch Nutz- und Kulptpflanzen befallen [Brasier 2005, Rizzo 2002], kommt dem Nachweis dieser Pflanzenschädlinge eine umwelt-, ernährungs- und wirtschaftsbezogene Bedeutung zu.

Zur Unterscheidung der oben genannten *Phytophthora*-Arten wurde eine auf der ribosomalen DNA befindliche ITS-Region (*engl. internal transcribed spacer*) gewählt, da diese eine hohe artspezifische Variabilität aufweist. Zunächst wurden die immobilisierten Goldnanopartikel mit thiol-modifizierter ssDNA (cKER für *P. kernoviae* bzw. cRAM für *P. ramorum*) funktionalisiert, die komplementär zu den ITS-Sequenzen der beiden *Phytophthora*-Arten sind (KER bzw. RAM; siehe auch Abschnitt 3.1.4. für Oligo-Sequenzen). Der Nachweis erfolgte durch die Hybridisierung von KER und RAM an die funktionalisierten Nanopartikel. Als Negativkontrolle wurden RAM bzw. KER mit den nicht-komplementären-funktionalisierten Nanopartikel inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

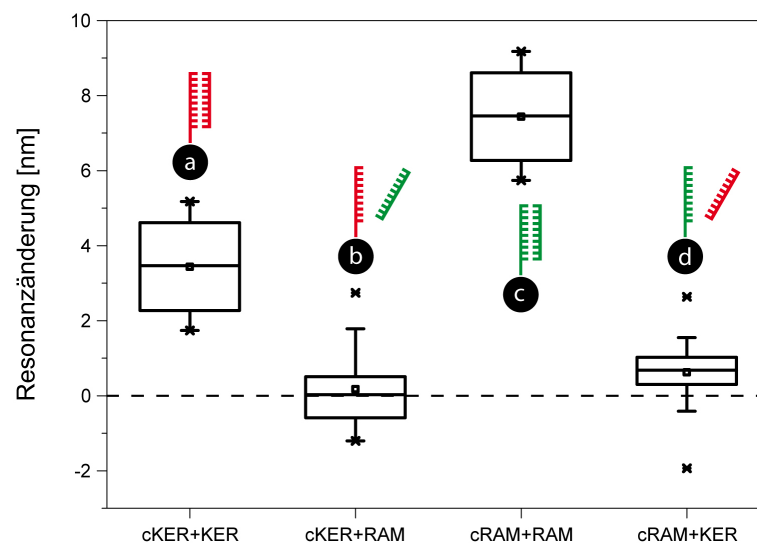


Abbildung 4.22: Nachweis von *Phytophthora*-Arten über die Resonanzänderung der Goldnanopartikel. a) und b) wurden mit *P. kernoviae*-spezifischer DNA funktionalisiert, c) und d) mit *P. ramorum*-spezifischer DNA. In a) und c) wurde mit der komplementären Analyt-DNA inkubiert, b) und d) jeweils mit nicht-komplementärer DNA als Negativkontrolle (Hybridisierungsbedingungen: siehe Abschnitt 3.2.3.1).

Während die Negativkontrollen b) und d) mit Ausnahme von Ausreißern im Fehlerbereich der Messmethode liegen (Resonanzänderung < 0,5 nm), zeigen die Hybridisierungsversuche mit komplementärer DNA (KER an cKER und RAM an cRAM) mit 3,5 nm bzw 7,4 nm bereits

eine deutliche Verschiebung des Streuspektrums zu höheren Wellenlängen. Bei Konzentrationen der Analyt-DNA von 1 $\mu\text{mol/l}$ ist die Sättigung der Sensoroberfläche gegeben, so dass die nicht erfolgte Anbindung von RAM an cKER bzw KER an cRAM aufgrund der fehlenden Komplementarität der Basen zurückzuführen ist. Dadurch konnte die Anwendbarkeit der Einzelpartikelsensorik unter den in dieser Arbeit entwickelten Testbedingungen für die Identifizierung von *Pythophthora*-Arten demonstriert werden.

4.4.6. Sensitivitätsvergleich der Nanopartikel mit EBL-strukturierten Transducern

In Abschnitt 4.2.1 wurde bereits auf die spektrale Linienbreite von EBL-strukturierten Nanopartikeln eingegangen. Dabei wurden Werte zwischen 50 und 70 nm ermittelt. Da die Güte von Nanopartikeln hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Brechungsindexänderungen als Verschiebung der Plasmonresonanz je RIU gegen die Linienbreite definiert ist, wurde nun der Nachweis von Analyt-DNA auf EBL-Nanostrukturen mit denen der chemisch synthetisierten Goldkugeln verglichen. Die experimentell bestimmten Verschiebungen der Streupeaks sind in Abbildung 4.23 für Goldkugeln, Goldscheiben, Goldringe und Gold-Spaltringe dargestellt. Während die Goldscheiben eine geringe Erhöhung des Signals um etwa 1 nm Rotverschiebung gegenüber den 2,6 nm von Goldkugeln zeigen, zeigen die Goldringe mit 13,4 nm und besonders die Gold-Spaltringe mit 27,5 nm eine deutlich Änderung des Streuspektrums nach Anbindung der Analyt-DNA.

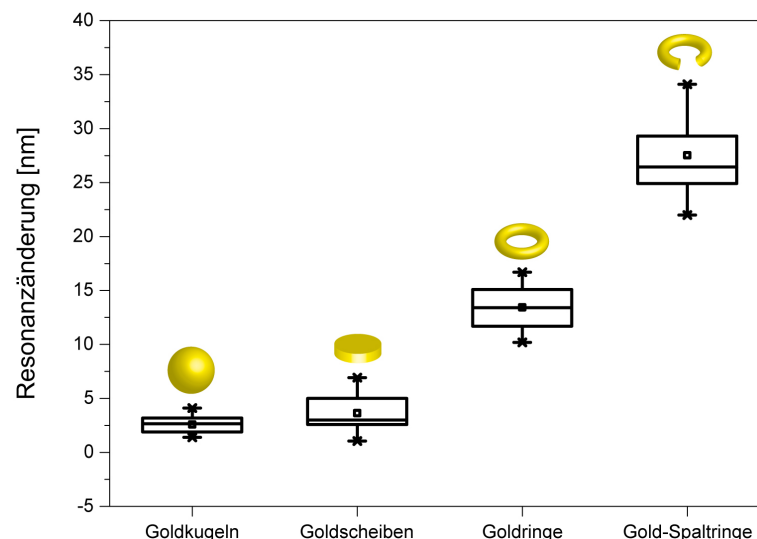


Abbildung 4.23: Änderung der Resonanzverschiebung nach Anbindung von Analyt-DNA durch Verwendung von EBL-strukturierten Nanostrukturen als Transducer. Während mit Goldscheiben eine vergleichbare Änderung der Resonanzposition nach DNA-Hybridisierung erreicht wird, können für

Goldringe bzw. Gold-Spaltringe Resonanzverschiebungen von ca. 13 nm bzw. 28 nm detektiert werden.

Aus den ermittelten Verschiebungen der Resonanzposition und den spektralen Linienbreiten ergaben sich folgende Sensitivitäten bzw. FOMs für die verwendeten Nanopartikel:

Partikelart	$\Delta\lambda$ [nm]	S [nm/RIU]	Linienbreite [nm]	FOM
Goldkugel	2,6	5,2	26	0,20
Goldscheibe	3,6	7,2	45	0,16
Goldring	13,4	26,8	68	0,39
Gold-Spaltring	27,5	55,0	57	0,96

Tabelle 4.1: Vergleich der sensorischen Eigenschaften verschiedener Nanopartikelarten. Dargestellt sind die Resonanzverschiebung nach Anbindung von Analyt-DNA und die daraus ermittelte Sensitivität der einzelnen Nanopartikel. Über die aus den Fitparametern der Streuspektren gewonnenen Linienbreiten wurde der FOM bestimmt.

In Tabelle 4.1 wird deutlich, dass die größere Signaländerung bei Goldscheiben durch die größere Linienbreite einen geringen FOM als die Goldkugeln aufwies. Während der FOM für Goldringe gegenüber den Goldkugel und Goldscheiben bereits doppelt so groß ist, zeichnen sich die Gold-Spaltringe durch eine besonders hohe Sensitivität bei einem FOM von 0,96 aus. Zusammengefasst ließ sich beobachten, dass die EBL-strukturierten Nanopartikel zwar eine 2- bis 3-fach so große Linienbreite zeigen, ihr FOM allerdings durch die mit bis zu 10-fach größere Rotverschiebung ebenfalls deutlich größer ist.

4.4.7. Qualitativer Nachweis von Proteinen

Neben dem Nachweis der Hybridisierung einzelsträngiger DNA mit dem jeweils komplementären Doppelstrang liefern traditionell insbesondere Antigen-Antikörper-Interaktionen wichtige diagnostische Informationen, wie z. B. über Infektionen mit Krankheitserregern bzw. deren infektiöse Ausscheidungsprodukte. Der hier entwickelte Nanosensor sollte in einem *Proof-of-Principle*-Versuch den Nachweis der Antigen-Antikörper-Interaktion auf, mit Modell-Antikörpern funktionalisierten, Goldnanopartikeln erbringen.

Das nachzuweisende Antigen wurde für zwei Stunden auf dem vorbereiteten Sensor (siehe Abschnitt 3.2.2.2.: Funktionalisierung mit Antikörpern) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Einzelpartikel erneut vermessen. Im Dunkelfeld

konnte eine sichtbare Zunahme der Streuintensität dieser Partikel beobachtet werden, bei einigen sogar eine Farbänderung vom Grünen ins Gelbliche, was auf ein weiteres Wachstum der Proteinhülle um den Nanosensor hindeutete. Dieses Ergebnis konnte anschließend mittels Streuspektroskopie belegt werden. Hier konnte ein weiterer Anstieg der Streuintensität sowie eine deutliche Rotverschiebung der Resonanzposition verzeichnet werden (Abbildung 4.24).

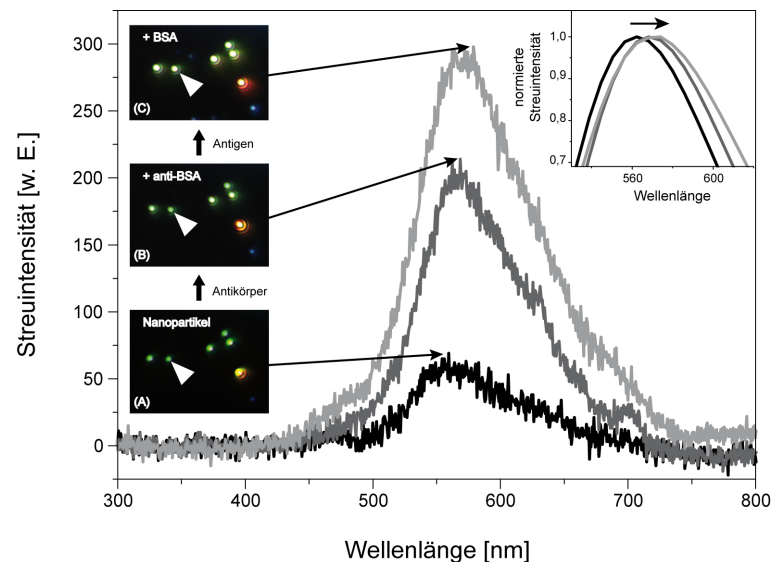


Abbildung 4.24: Dunkelfeldaufnahmen und Streuspektren eines 80 nm Gold-Nanopartikels (a) nach Funktionalisierung mit einem Antikörper (b) und nach Anbindung des entsprechenden Antigens (c). Eine messbare Rotverschiebung kann für jeden Schritt beobachtet werden und ein Anstieg der Streuintensität ist sichtbar. Die Dunkelfeldbilder bestätigen diese Änderung des lokalen Brechungsindex durch eine Farbänderung von grün zu hellgelb bei einem zusätzlichen Anstieg der Helligkeit nach jedem Schritt.

Mit Hilfe der Mie-Theorie ist es möglich, die Änderung der Resonanzwellenlänge von Nanopartikeln nach der Anbindung von Antigenen bzw. Antikörpern zu ermitteln. Für die Berechnung sind dabei bekannte Faktoren, wie Material (Gold) und Durchmesser (80 nm) der Partikel, zu berücksichtigen. Zusätzlich sind aus der Literatur der Brechungsindex von Proteinen ($n_{\text{Protein}} = 1,5$) sowie deren hydrodynamischer Durchmesser (welcher über die Molekülmasse berechnet werden kann [Squire 1979]) bekannt, der als Dicke der Proteinhülle um den Nanopartikel angenommen wird. In Abbildung 4.25 ist die maximale Verschiebung der Plasmonresonanz in Abhängigkeit von verschiedenen Schichtdicken dargestellt. Es werden Schichtdicken von 3 nm für das Antigen und 6 nm für den Antikörper angenommen. Aus diesen Daten ergibt sich eine Gesamthöhe des Antigen-Antikörper-Komplexes von etwa 9 nm. Diese Be-

rechnungen dienten als Grundlage für die Abschätzung der Oberflächenbedeckung im Experiment. Dabei wurden die Streuspektren individueller Goldkugeln vor und nach der Anbindung von Antigenen und/oder Antikörper gemessen. Die ermittelten Verschiebungen der maximalen Position der Streuspektren sind in Abbildung 4.25 dargestellt.

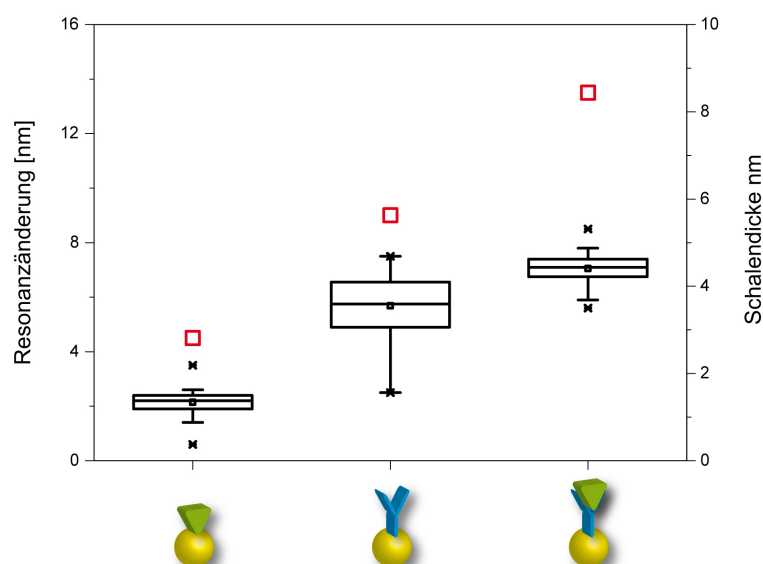


Abbildung 4.25: Resonanzverschiebung der Streuspektren einzelner Gold-Nanopartikel nach Anbindung von Antigenen und/oder Antikörpern. Die theoretisch berechneten Werte sind als rot dargestellt. Das Antigen (links) zeigt dabei die geringste Änderung, während bei zunehmender Molekülgröße von Antikörper (Mitte) zum Antigen-Antikörper-Komplex die Verschiebung deutlich größer wird.

Aus der berechneten und gemessenen Änderung der Resonanzposition konnte der Bedeckungsgrad der Partikeloberfläche abgeschätzt werden. Dazu wurde der Mittelwert der Verschiebung in einem Plot mit der über die Mie-Theorie bestimmten Bedeckungsdichte aufgetragen (siehe Abbildung 4.26). Dabei wurde eine Bedeckung der Oberfläche von etwa 58 % für das nachzuweisende Antigen mit den erwähnten Annahmen der Schichtdicken abgeschätzt.

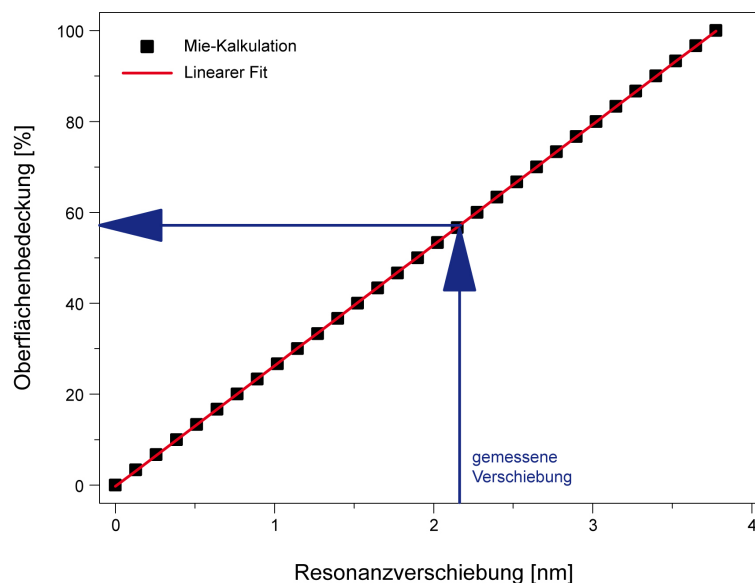


Abbildung 4.26: Die Peak-Wellenlänge ist als Plot der relativen Resonanzverschiebung und der resultierenden Oberflächenbedeckung der Proteinhülle dargestellt. Der lineare Fit erlaubt dabei die Vorhersage über die Dichte der Partikel-gebundenen Antigene anhand der gemessenen spektralen Verschiebung bei bekannter Schichtdicke sowie bekanntem Brechungsindex.

4.5. Vergleich LSPR - SPR

Die beschriebenen Untersuchungen zur Anbindung von einzelsträngiger DNA auf funktionalisierten Nanopartikeln sollten mit den Ergebnissen zu Hybridisierungsversuchen auf planaren Goldsubstraten unter Verwendung der SPR-Spektroskopie verglichen werden. Dazu wurden die Inkubationszeiten und Konzentrationen für die Fänger-Anbindung und Analyt-Hybridisierung gleich gewählt. Die Fänger-DNA wurde nach dem Protokoll für die LSPR-Sensorik auf der Goldoberfläche angebunden. Nach dem Einlegen des SPR-Substrats in das SPR-Spektrometer wurde die Analyt-DNA über die funktionalisierte Gold-Oberfläche geleitet und die Brechungsindexänderung über die Zeit gemessen (siehe Abbildung 4.27). Nach dem Spülen mit Laufpuffer konnte die ungebundene bzw. unspezifisch angelagerte Analyt-DNA entfernt werden, während das resultierende Signal die erfolgreiche Hybridisierung widerspiegelt. In Abbildung 4.28 ist die Signaländerung für verschiedene Analyt-Konzentrationen aufgetragen (schwarz Punkte). Aus den Parametern der Fit-Funktion (rote Linie) können die Assoziationskonstante und das Detektionslimit bestimmt werden.

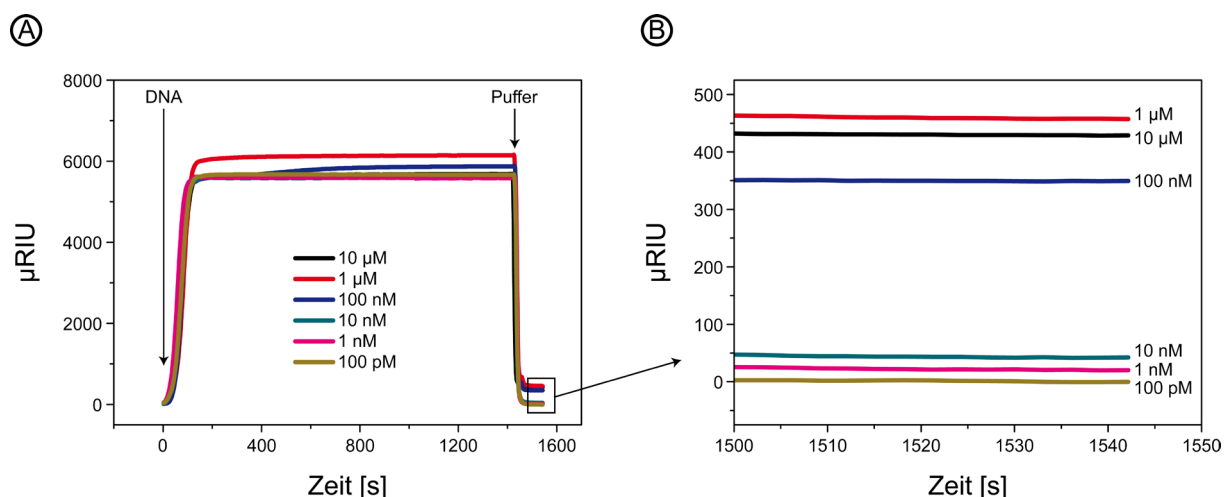


Abbildung 4.27: (A) SPR-Signal für verschiedene Konzentrationen der Analyt-DNA. Nach dem Spülen mit Laufpuffer gibt das resultierende Signal, abzüglich der Basislinie (Signal vor Zugabe von Analyt-DNA), die Brechungsindexänderung durch die hybridisierte DNA an. (B) Vergrößerte Darstellung des resultierenden Signals (siehe Kasten in (A)) nach erfolgter Hybridisierung und Waschprozess.

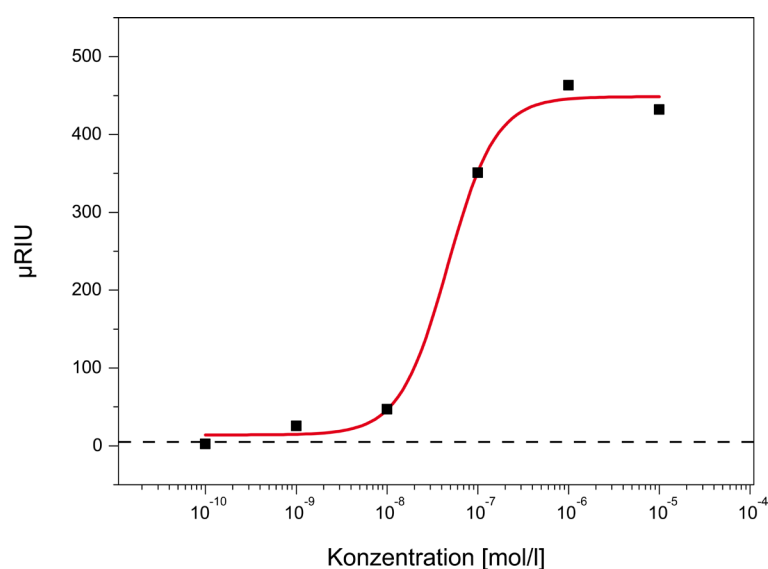


Abbildung 4.28: SPR-Signaländerung nach Anbindung verschiedener DNA-Konzentrationen. Bei Konzentrationen über $1 \mu\text{mol/l}$ ist keine weitere Signalzunahme zu detektieren, während Konzentrationen unter 1 nmol/l nicht mehr nachweisbar sind. Aus den Parametern der Fit-Kurve (rot) kann die Assoziationskonstante von $2,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden.

Zum Vergleich der LSPR- und SPR-Ergebnisse für den sensorischen Nachweis von Hybridisierungsereignissen auf individuellen Goldnanopartikeln und planaren Goldsubstraten sind alle wichtigen Daten nochmals in Tabelle 4.2 aufgelistet. Der deutliche Unterschied der Sensoroberfläche einer 80 nm-Goldkugel gegenüber der planaren Goldoberfläche des SPR-Chips,

der etwa das 530-millionenfache beträgt, sticht besonders hervor. Während die zu detektierende DNA-Konzentration für die SPR-Versuche um eine Zehnerpotenz niedriger lag als bei den LSPR-Experimenten, so ist die tatsächlich auf dem Nanopartikel nachgewiesene Anzahl an DNA-Strängen deutlich geringer. Mit knapp über 2000 Molekülen (ausgehend von der maximalen Bedeckungsdichte) detektiert eine 80 nm Goldkugel etwa $5 \cdot 10^7$ Mal weniger Moleküle als das SPRS. Aus den Ergebnissen zur Konzentrationsabhängigkeit des Analyt-Nachweises lässt sich über eine Fit-Kurve (Hill-Fit) die Assoziationskonstante der zur DNA-Anbindung bestimmen. Diese ist für DNA-Hybridisierungen auf einem Goldnanopartikel etwa 2,6 Mal größer ist als für SPR-Versuche, wodurch die höhere Affinität der Analytmoleküle zur Partikeloberfläche belegt wird.

	LSPR	SPR
Transducer	Goldkugel (Ø 80 nm)	dünner Goldfilm (50 nm)
Signal	$\Delta\lambda$ [nm]	$\Delta\theta$ [m°]
Auflösungsgrenze (Z)	0,5 nm	0,073 m° (1 μ RIU)
Sensorfläche [μm^2]	$2,01 \cdot 10^{-2}$	$1,07 \cdot 10^7$
Sensorfläche LSPR/SPR	1	$5,3 \cdot 10^8$
max. Bedeckungsdichte	$3,6 \cdot 10^3$ Oligonukleotide	$1,9 \cdot 10^{12}$ Oligonukleotide
Detektionslimit ssDNA	10^{-8} mol/l	10^{-9} mol/l
Sensitivität (S_B)	143 nm/RIU	66124 m°/RIU
Sensitivität (S_S)	5,2 nm/RIU	198,9 m°/RIU
norm. Signal (S/Z)	10,4 je RIU	2724,7 je RIU
Signal je DNA-Strang	$2,9 \cdot 10^{-3}$ je RIU	$1,2 \cdot 10^{-9}$ je RIU
detektierbare Molekülzahl	$2,1 \cdot 10^3$ Oligos	$1,1 \cdot 10^{11}$ Oligos
Assoziationskonstante	$6,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$	$2,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$

Tabelle 4.2: Vergleich der Sensoreigenschaften und Messergebnisse von LSPR und SPR für die Hybridisierung von einzelsträngiger DNA.

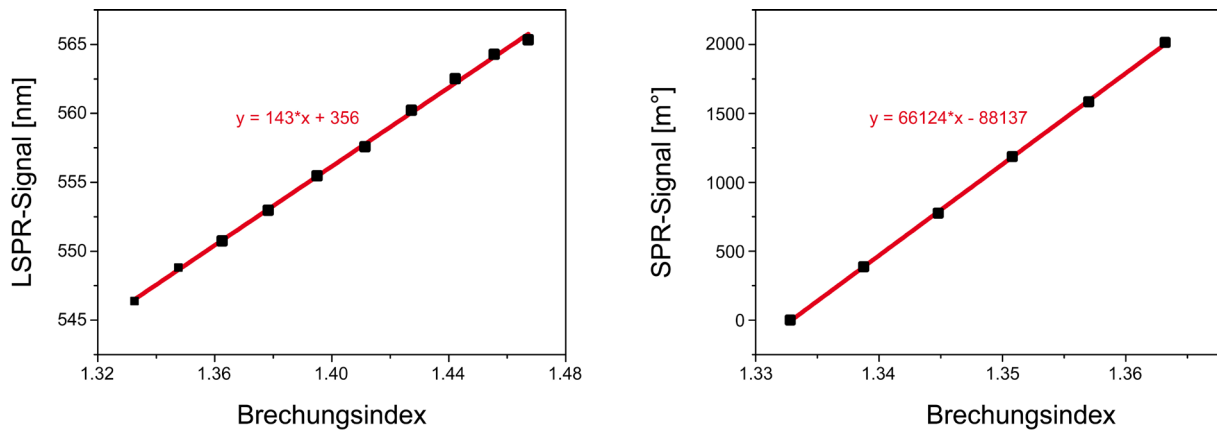


Abbildung 4.29: Bulk Sensitivität (S_B) der der LSPR- und SPR-Versuche. Über eine Konzentrationsreihe mit Dimethylsulfoxid (DMSO) als Umgebungsmedium kann S_B aus dem Anstieg der linearen Fit-Gerade abgelesen werden.

Die mit Hilfe der Einzelpartikelsensorik gewonnenen Ergebnisse zur Hybridisierungseffizienz (Abb. 4.30), zur Spezifität (Abb. 4.31) und zur Signalverstärkung (Abb. 4.32) wurden nachfolgend mit den Messungen mittels SPRS verglichen. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die Daten auf jeweils ein DNA-System normiert (Wert auf 1 gesetzt), um die Signaländerung zu verdeutlichen.

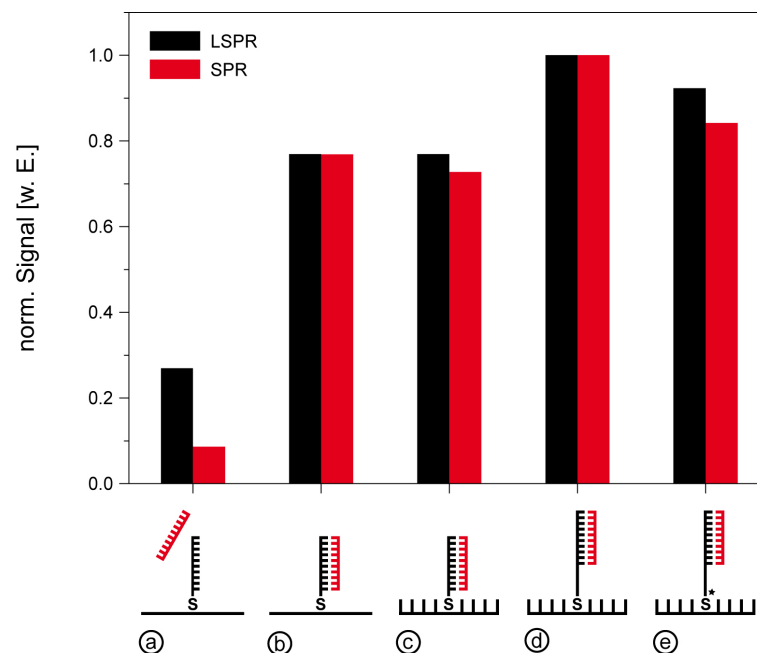


Abbildung 4.30: Normiertes SPR/LSPR-Signal für die Untersuchung zur Hybridisierungseffizienz.

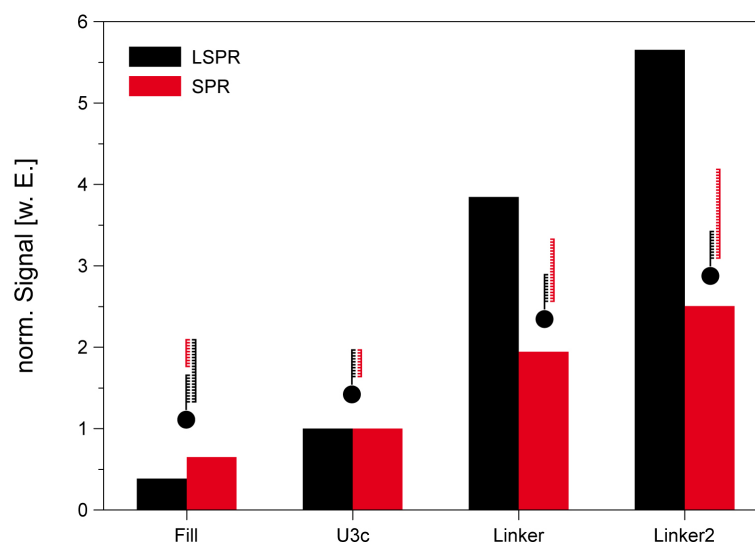


Abbildung 4.31: Normiertes SPR/LSPR-Signal zur Anbindung verschieden langer DNA-Fragmente.

Vergleicht man die in Abb. 4.30 dargestellten Resultate, so wird deutlich, dass zwischen dem Nanopartikel-Sensor und dem Goldsubstrat keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der angewendeten Funktionalisierungsstrategie auftreten. Lediglich die Negativkontrolle (Abb. 4.30 a) hebt sich etwas deutlicher von den anderen Messungen ab und erlaubt damit eine klarere Differenzierung zwischen gebundenem und nicht gebundenem DNA-Strang. Werden jedoch unterschiedlich lange DNA-Fragmente bzw. gleichlange DNA-Fragmente mit unterschiedlichem Abstand zur Sensoroberfläche an gebunden, so sind über die Einzelpartikelspektroskopie deutlich größere Signalunterschiede messbar (Abb. 4.31). Während sich mit der SPRS das Signal bei Verdopplung der DNA-Länge ebenfalls verdoppelt, wird auf einem Einzelpartikel eine 4-fache Signaländerung messbar (vergleiche Abb. 4.31 U3c und Linker). Besitzt das DNA-Fragment die gleiche Anzahl an Basen, ist jedoch weiter von der Sensorfläche entfernt, so zeigt auch hier die LSPR-Sensorik eine deutlichere Signaländerung gegenüber der SPRS (vergleiche Abb. 4.31 Fill und U3c).

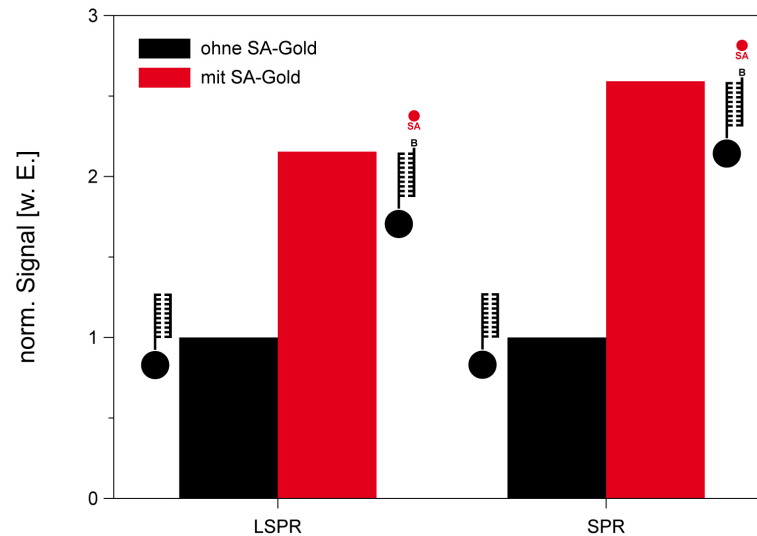


Abbildung 4.32: Normiertes SPR/LSPR-Signal zur Signalverstärkung mittels Nanopartikelanbindung.

Die Signalverstärkung durch die Anbindung von SA-Gold an die biotinylierte Analyt-DNA zeigt eine etwas größere Signaländerung für das planare Sensorsubstrat. Während sich das Signal um etwa das 2,5-fache verändert, wird auf dem Einzelpartikelsensor das Signal lediglich verdoppelt. Zusammengefasst lässt sich der Nachweis von Hybridisierungsereignissen auf beiden Systemen mit vergleichbaren Ergebnissen durchführen, wobei die LSPR-Sensorik besonders in ihrer Spezifität einen deutlichen Vorteil hat.

5. Diskussion

5.1. Grenzen der Einzelpartikelspektroskopie

Im ersten Schritt wurde die Einzelpartikelspektroskopie hinsichtlich ihrer *Auflösungsgrenze für die Biosensorik untersucht*. Dabei wurden sowohl systematische als auch gerätebedingte Fehlerquellen in die Auswertung der Streuspektren einbezogen. Vor der Messung der Streuspektren waren hier besonders die Reinigungsschritte vor der Partikel-Immobilisierung auf dem Glassubstrat wichtig. Nur so konnte hohes Signal-Rausch-Verhältnis erlangt werden, da bereits kleinste Kontaminationen störend das einfallende Licht gestreut haben. Nach Fixierung der Nanopartikel wurde deren Dichte und Verteilung auf dem Substrat mit Hilfe der Dunkelfeldmikroskopie bestimmt. Ein minimaler Abstand der Partikel von etwa 1 μm war nötig, um optische und elektrische Kopplungseffekte zwischen den Partikeln zu verhindern, die einen großen Einfluss auf das Streuspektrum des einzelnen Partikels haben konnten. Hatte man beispielsweise zwei Nanopartikel mit einem Abstand von weniger als 500 nm beieinander liegen, so wurde im Dunkelfeldbild lediglich ein einziger Streuquerschnitt sichtbar. Das resultierende Streuspektrum wäre dann die Summe der Flächen unterhalb der individuellen Spektren der beiden Partikel (siehe Schema in Abb. 5.1).

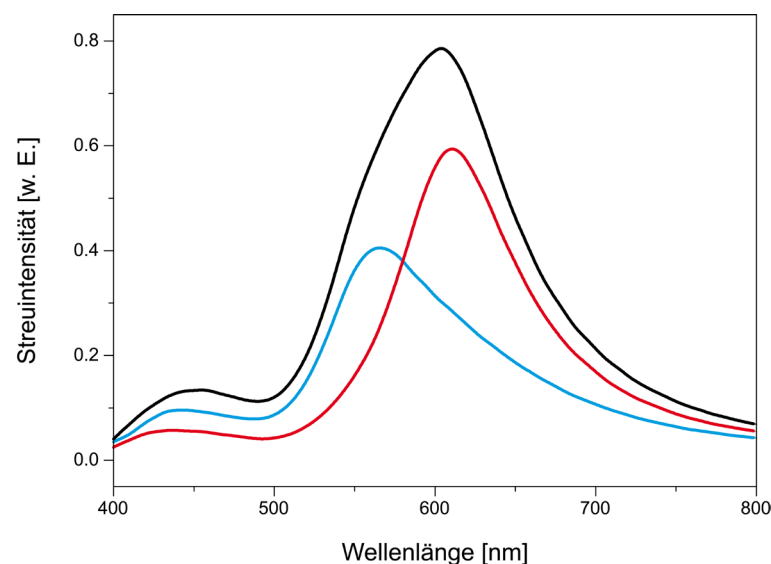


Abbildung 5.1: Streuspektrum von dicht benachbarten Nanopartikeln (schwarz). Das Spektrum ergibt sich aus dem Flächeninhalt unter den individuellen Streuspektren der beiden Nanopartikel (blau und rot).

Für die biosensorische Anwendung hätte das einen großen Nachteil. Das resultierende Streuspektrum kann sich durch diese Addition der einzelnen Spektren sowohl zu höheren, als auch zu niedrigeren Wellenlängen verschieben, wodurch eine Aussage über die Interaktion von Biomolekülen schwer nachvollziehbar wäre. Daher mussten die Glassubstrate mit den immobilisierten Nanopartikel immer mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht werden, um Partikelaggregate und einzelne Nanopartikel unterscheiden zu können. Gleichzeitig konnten Partikel, die stark in Form und Größe von den verwendeten Nanoteilchen abwichen, detektiert werden, um sie bei folgenden Messungen auszuschließen.

Für eine weitere *Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses* war die Spektrenprozessierung wichtig, um den Einfluss aller Lichtquellen zu minimieren. Die systematischen Fehler wurden durch Mehrfachmessungen der Nanopartikel nach Waschschritten in Salzpuffer untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass sich eine geringe Rotverschiebung der Resonanzposition von ca. 0,5 nm nicht gänzlich vermeiden ließ, was vermutlich durch lokale Brechungsindexänderungen durch nicht entfernte Salzreste bzw. Wassermoleküle hervorgerufen wurde. Zusätzlich waren die genaue Positionierung im Messfleck des Spektrometers und die Fokussierung der zu vermessenden Nanopartikel notwendig, um weitere Fehlerquellen durch die Optik des Mikroskop-Aufbaus zu vermeiden.

5.2. Optische Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln

Warum die *Wahl des Signalwandlers* auf individuelle Nanopartikel – anstatt auf Partikel-Ensemble – fiel, wurde bereits in der Einleitung erörtert. Beide Varianten haben dabei ihre Vor- als auch Nachteile. Konventionelle Extinktionsspektren von Partikelkollektiven umfassen für gewöhnlich über 10^{10} Nanopartikel in 1 ml Lösung. Diese Methode ist daher sinnvoll, wenn man die optischen Eigenschaften von monodispersen Nanopartikellösungen bestimmen möchte. Da die lokalisierte Oberflächenplasmonresonanz allerdings stark von der Form und Größe der Nanopartikel abhängig ist, zeigt die Extinktionsspektroskopie signifikante Limitierungen hinsichtlich der Untersuchung komplexer, polydisperser Partikellösungen. In Partikel-Populationen mittelt sich die Resonanzlage über viele Nanopartikel aus, wodurch sie eine relative große Linienbreite gegenüber dem Einzelpartikelspektrum zeigen. Die Einzelpartikelspektroskopie liefert daher im Vergleich zur Ensemble-Spektroskopie eine genauere Aussage über die spektrale Information individueller Nanopartikel [Sönnichsen 2001]. Neben einer geringeren Konzentration des nachzuweisenden Analyten hat die Einzelpartikelmessung weitere Vorteile gegenüber den Ensemble-Messungen. Besonders die inhomogene Verbreiterung

der optischen Spektren durch die zwangsläufig bei Ensemble-Messungen auftretende Größenverteilung kann als Nachteil gegenüber dem Einzelpartikel-Assay gewertet werden.

Nach der Fehler-Minimierung und Bestimmung der Auflösungsgrenze musste eine geeignete Partikelart für die biosensorische Anwendung gewählt werden. Dazu wurden sowohl chemisch synthetisierte als auch durch Elektronenstrahlolithographie hergestellte Nanopartikel untersucht. Die von Gustav Mie publizierte Theorie über kolloidaler Lösungen aus Edelmetall-Nanopartikeln beschreibt, dass deren optische Eigenschaften von intrinsischen (Größe, Form, Material) und extrinsischen (Brechungsindex des Umgebungsmediums) Faktoren abhängig sind. Mit Hilfe der Mikrospektroskopie (hier eingesetzt als: Einzelpartikelspektroskopie) konnten in der vorliegenden Arbeit die Einflüsse dieser Faktoren auf Einzelpartikel-ebene untersucht werden. Dabei wurden die zu untersuchenden Nanopartikel mit Weißlicht seitlich durch einen Dunkelfeldkondensor beleuchtet und das resultierende Streulicht von einem Mikroskop-Objektiv eingefangen. Weitergeleitet an ein Gitterspektrometer, konnte das ankommende Streulicht ausgewertet und als Spektrum dargestellt werden. Neben der Streuintensität waren dabei vor allem die Position des Streupeaks und die Linienbreite der Spektren auswertbare Größen für den Vergleich der optischen Eigenschaften verschiedener Nanopartikel. Zum Vergleich wurden sowohl chemisch synthetisierte Nanopartikel als auch mittels EBL strukturierte Nanostrukturen herangezogen. Im Herstellungsprozess hatten die lithographisch hergestellten Nanopartikel den Vorteil, dass sie sich bereits auf einem Substrat und in definierten Abständen zu den anderen Partikeln befinden. Die Substratbedeckung der chemisch synthetisierten Nanopartikel wurde über die Verdünnung der Partikellösung und die Inkubationszeit eingestellt, wodurch sich Partikelcluster auf der Oberfläche nicht immer verhindern ließen. Da die Dunkelfeldmikroskopie dicht benachbarte Nanopartikel (Abstand unter 500 nm) nicht als einzelne Punkte auflösen kann, war eine Rasterkraftmikroskopie-Aufnahme vor der Messung der Streuspektren hilfreich.

Als potentielle Transducer für die Biosensorik wurden Goldkugeln, Golddreiecke und Silberdreiecke (alle chemisch synthetisiert), aber auch Goldscheiben, Goldringe und Goldspaltringe (alle EBL-Strukturen) hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften untersucht. Dabei lagen die Resonanzmaxima im Bereich von 550 nm bis 650 nm, während lediglich die Ring- und Spaltringstrukturen Licht bei 750 nm bis 850 nm streuen. Die spektrale Linienbreite lag für die verwendeten *bottom-up*-Nanopartikel bei maximal 40 nm, wobei besonders die Goldkugeln und Golddreiecke mit ca. 25 nm sehr schmale Linienbreiten aufwiesen. Die Streuspek-

tren der *top-down*-Nanopartikel waren mit Werten zwischen 40 nm und 70 nm deutlich breiter als die der chemisch synthetisierten Nanoteilchen.

Die Untersuchungen zur Anwendbarkeit der Einzelpartikelspektroskopie für die DNA- und Proteinanalytik wurden mit *80 nm Goldkugeln als Transducer* durchgeführt. Neben der einfachen Synthese dieser Partikel waren die schmale Linienbreite und die relativ hohe Streuintensität von Vorteil. Zudem konnte in Bezug auf die Größe der Goldkugeln bereits gezeigt werden, dass ein Durchmesser von 80 nm einen besonders hohen FOM aufweist [Kvasnička 2008]. Für das verwendete Material (Gold) der Nanopartikel sprach die gute Funktionalisierbarkeit über die Thiol-Gold-Wechselwirkung sowie deren Langzeitstabilität. Besonders die ebenfalls untersuchten Silberdreiecke zeigten Oxidations- und Alterungsprozesse an Luft, wobei sich die dadurch verursachten Form- und Größenänderungen als große Nachteile herausgestellt haben.

5.3. Biosensorik auf Nanopartikeln - Theoretische Betrachtung

Neben Untersuchungen zu den optischen Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln wurde gleichzeitig die Möglichkeit genutzt, lokale Brechungsindexänderungen über eine Verschiebung des Streuspektrums zu höheren Wellenlängen mit Hilfe der Einzelpartikelspektroskopie zu detektieren. Die *Mie-Theorie für Schalenpartikel* wurde eingesetzt, um bereits vor der Ausführung der Experimente auf das zu erwartende Ergebnis schließen zu können. Hierzu wurde angenommen, dass die nachzuweisenden Biomoleküle fest mit der Partikeloberfläche verbunden sind. Sie bilden um das Nanopartikel eine wenige Nanometer dicke Schicht, deren Brechungsindex vom jeweiligen Molekül abhängig ist. Zusätzlich ist der Brechungsindex des Partikel-umgebenden Mediums als auch des Partikels selbst bekannt, wodurch die Resonanzverschiebung einer 80 nm großen Goldkugel für die verschiedenen Schichtdicken an Biomolekülen berechnet werden konnte.

Aus den Berechnungen konnte ermittelt werden, dass sich unabhängig vom Umgebungsmedium eine *Verschiebung der Resonanzwellenlänge zu höheren Wellenlängen durch Anlagerung von Proteinen oder DNA* ergibt. Dabei ist die Resonanzänderung umso größer, je dicker die Schicht aus Biomolekülen um das Partikel ist. Es konnte eine lineare Abhängigkeit der Resonanzposition zum Wachstum der Hülle gezeigt werden. Eine stärkere Verschiebung des Streuspektrums konnte für Luft als Umgebungsmedium ermittelt werden, während die Änderung in einem flüssigen Medium geringer ausfällt. Zurückzuführen ist das auf die geringere Änderung des Brechungsindex von Wasser zu Biomolekül, die bei $\Delta n = n_{\text{Bio}} - n_{\text{Wasser}} =$

0,17 liegt. Bei Messungen an Luft hingegen läge Δn bereits bei 0,5 und wäre damit deutlich größer als in Wasser. Für Endpunktmessungen zur Bestimmung von geringen Molekülkonzentrationen kann durch die *Messung an Luft eine Verbesserung der Nachweisgrenze* erwartet werden und kam daher für die experimentelle Bestimmung von Biomolekül-Interaktionen zum Einsatz.

5.4. (Bio-) Funktionalisierung des Signalwandlers

Die Funktionalisierung der Nanopartikel unter verschiedenen Immobilisierungskonditionen wurde mit Hilfe der Mikrospektroskopie charakterisiert, da bereits kleinste Änderungen der Oberflächenbedeckung einen Einfluss auf das Streuspektrum der Partikel hatten. Während die Inkubation der Goldkugeln mit unmodifizierter Fänger-DNA nur eine leichte Änderung des Streupeaks aufgrund von unspezifischer Anlagerung der DNA zur Folge hatte, konnte durch die *Verwendung einer Thiol-Gruppe* das Signal deutlich um etwa 4 nm verschoben werden. Selbst die nachfolgende Inkubation von MCH führte zu einer weiteren, wenn auch mit ca. 0,5 nm geringen Verschiebung der Streumaxima. Grund hierfür war vermutlich die Tatsache, dass sich die Fänger-DNA aufgrund der durch das *MCH passivierten Oberfläche* weiter aufgerichtet hat und damit weiter in das Medium hineinragt. Außerdem wurden durch die Konkurrenz der Thiol-Gruppen von MCH auch einige DNA-Stränge von der Oberfläche verdrängt [Georgiadis 2000]. Die Hülle aus Biomolekülen war damit dicker und bewirkte eine weitere Signaländerung, die mikrospektroskopisch verfolgt werden konnte. Der gleiche Effekt konnte für den *zusätzlich eingeführten poly-A-Spacer* beobachtet werden. Lediglich die Voraktivierung der Thiol-Gruppe mit TCEP zeigte keinen Effekt.

Die dargestellten Ergebnisse können allerdings nur als Anhaltspunkt für die erfolgreiche Sensorpräparation verwendet werden, da die gemessenen Rotverschiebungen keine Aussage über die Qualität des Nanosensors treffen können. Erst nach erfolgter Inkubation mit der Analyt-DNA und der damit verbundenen Änderung des Streuspektrums kann ermittelt werden, welche der Methoden der Oberflächenfunktionalisierung ein verlässlich hohes Signal liefert und gegenüber den anderen Methoden eine besonders hohe Sensitivität zeigt. Der folgende Abschnitt wird sich hauptsächlich mit der Erkennung des Analyten sowie der Quantifizierung und einer möglichen Signalverstärkung beschäftigen.

5.5. Detektion von DNA-Hybridisierungsereignissen auf Einzelpartikelebene

5.5.1. Nachweis von Hybridisierungsereignissen und Detektionslimit

In den Hybridisierungsversuchen wurde zunächst erfolgreich gezeigt, dass eine *einzelsträngige DNA mit einer Länge von 20 Basen über die Einzelpartikelspektroskopie detektierbar* ist. Die ermittelte Resonanzänderung nach Anbindung des Oligonukleotides, unter verschiedenen gewählten Immobilisierungsbedingungen der Fänger-DNA, konnte nicht direkt mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen auf planaren Oberflächen verglichen werden [Demers 2000, Getz 1999, Herne 1997, Levicky 1998]. Die erwartete Zunahme des Hybridisierungssignals durch die anschließende Ko-Adsorption von MCH blieb aus, was darauf zurückgeführt werden konnte, dass die Fänger-Moleküle bereits besser zugänglich sind als auf den planaren Substraten. Der zusätzliche *poly-A-Linker verstärkte das Signal* noch etwas, da die zu hybridisierende Sequenz so noch weiter von der Partikeloberfläche entfernt und damit besser für das Analyt-Molekül zugänglich war. Keinen weiteren Effekt auf das Hybridisierungssignal hatte die voraktivierte Thiol-Gruppe. Je weniger der in der Oligonukleotid-Lösung vorliegenden Thiol-Gruppen Disulfidbrücken aufgebaut hatten, desto weniger Einfluss hatte die Aktivierung mit TCEP, wodurch sich das gleichbleibende Signal mit bzw. ohne TCEP erklären lässt.

Die hier *ermittelte Untergrenze zur Detektion der DNA-Hybridisierung ist mit 10 nmol/l* im Vergleich zu anderen Nachweismethoden (SPR) nicht besonders empfindlich. Um jedoch das Signal der Mikrospektroskopie von einzelnen Nanopartikeln einordnen zu können, muss die Sensoroberfläche etwas näher betrachtet werden. Mit einer Oberfläche von lediglich $0,02 \mu\text{m}^2$ und einem Platzbedarf eines oberflächengebundenen Oligonukleotides von etwa $5,65 \text{ nm}^2$ [Georgiadis 2000] ergibt sich für eine Goldkugel mit einem Durchmesser von 80 nm eine *maximale Anzahl von etwa 3600 gebundenen DNA-Strängen*, die auf dem Nanopartikel Platz finden können. Diese Zahl wiederum entspricht einer *nachgewiesenen DNA-Konzentration von ca. 1 fmol/l*. Geht man nun davon aus, dass die Oberfläche aufgrund der Ko-Inkubation und anderen Faktoren nicht bei 100% liegt, kann die tatsächlich nachgewiesene Konzentration an Analyt-DNA sogar noch geringer sein. Genau auf dieser Tatsache basiert der Vorteil von individuellen Goldnanopartikeln für die Biosensorik, da bereits wenige hundert Moleküle über diese Methode detektierbar sind. Zudem muss angemerkt werden, dass es

sich bei dieser Nachweisreaktion um eine labelfreie Detektion handelt (vergleichbar der SPR-Spektrometrie). Mit den aus der Literatur bekannten Möglichkeiten zur Signalverstärkung kann das Detektionslimit zusätzlich gesenkt werden (siehe Kapitel 5.4.3.).

5.5.2. DNA-Sandwich-System

In diesem Abschnitt wurde die praktische Anwendbarkeit der Einzelpartikelsensorik für den *Nachweis von Hybridisierungsereignissen anhand eines DNA-Sandwich-Systems* gezeigt. Die einzelnen Stränge dieses Systems wurden dabei sowohl mit auf dem Sensor befindlicher Fänger-DNA als auch vor deren Anbindung auf dem Partikel hybridisiert. Die Hybridisierungsreaktionen in Lösung als auch auf dem Partikelsubstrat zeigten dabei keine Unterschiede in der Effizienz. Sowohl die Anbindung der vorhybridisierten Abschnitte (Abb. 4.20 c) als auch die schrittweise Bindung von Fänger (Abb. 4.20 a), Linker (Abb. 4.20 e) und Fill (Abb. 4.20 d) führte zu vergleichbaren Resonanzverschiebungen. Damit zeigte sich die Qualität des Nanosensors, einzelne chemische Bindungsereignisse über die Darstellung der Streuspektren individueller Nanopartikel verlässlich nachzuweisen.

Ein Vergleich der praktisch ermittelten Resonanzverschiebung mit den theoretisch zu erwartenden Werten ergab hinsichtlich des Molekulargewichts der DNA wichtige Ergebnisse zur Sensitivität des Einzelpartikelsensors. DNA-Moleküle mit gleichem Gewicht lieferten bei weiterer Entfernung zur Sensoroberfläche die erwartete niedrigere Verschiebung der Resonanzposition. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass ab einem Molekulargewicht von 15 kDA die Änderung der Plasmonresonanz nur noch geringfügig größer wird.

Schwieriger wird der Vergleich der gemessenen Resonanzänderung mit der Längenänderung der DNA. Anhand der Anzahl an Basen jedes DNA-Stranges lässt sich die Länge (auch *Konturlänge* genannt) berechnen. Dabei wird zwischen einzel- und doppelsträngigen Bereichen unterschieden, da sich die Flexibilität (wird durch die *Persistenzlänge* beschrieben) dadurch stark verändert. Die Persistenzlänge definiert hierbei die Länge der DNA, innerhalb derer das DNA-Molekül starr bzw. unbeweglich ist. Für einzelsträngige DNA mit ca. 20 Basen findet man in der Literatur Persistenzlängen von ca. 1-2 nm, während sie für ein doppelsträngiges DNA-Molekül zwischen 50-80 nm liegt [Hagerman 1988, Tinland 1997]. In Abb. 5.2 ist die Änderung der Konturlängen (Zustand vor und nach der Anbindung) der verwendeten DNA gegen die jeweils ermittelte Resonanzänderung aufgetragen. Für die Konturlängen wurden dabei 0,664 nm für eine Base in einem ssDNA-Strang und 0,332 nm für ein

Basenpaar im dsDNA-Strang angenommen. Der C6-Linker (siehe Material/Methoden) hat eine Länge von ca. 0,9 nm.

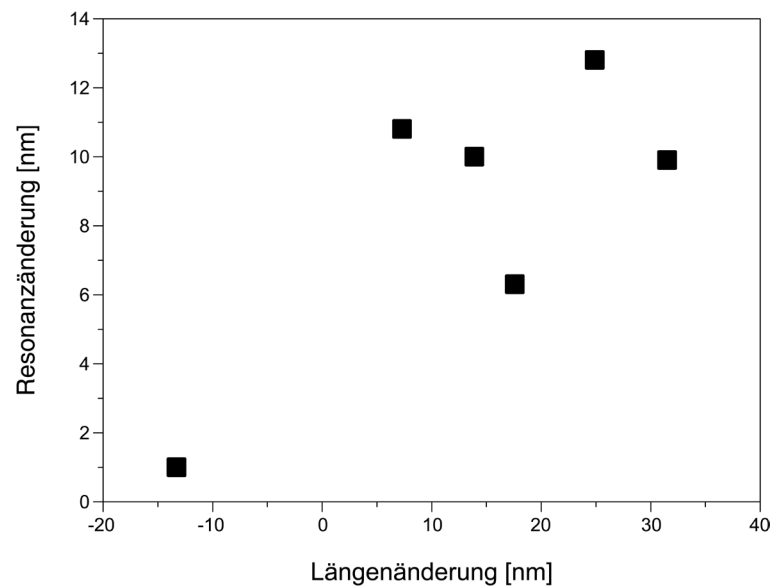


Abbildung 5.2: Theoretische Änderung der Konturlänge und die dabei ermittelte Resonanzverschiebung.

In Abb. 5.2 wird besonders die (theoretisch) negative Längenänderung bei gleichzeitiger Rotverschiebung der Resonanzposition sichtbar. Aufgrund der oben angegebenen Konturlänge der einzelsträngigen Fänger-DNA (ssDNA doppelt so lang wie dsDNA) sollte der Abstand zur Sensoroberfläche größer sein als nach der Hybridisierung. Die einhergehende Verringerung der Hülle um den Nanopartikel wäre also eine Verschiebung der Plasmonresonanz zu niedrigeren Wellenlängen zu erwarten, was in der Messung nicht der Fall ist. Grund hierfür ist die oben erwähnte Persistenzlänge der DNA. Die einzelsträngige Fänger-DNA steht nach der Immobilisierung nicht senkrecht auf der Partikeloberfläche; sie liegt vielmehr, da die Messung der Streuspektren an Luft ist, auf der mit MCH modifizierten Partikeloberfläche auf. Da die DNA nach der Hybridisierung eine wesentlich geringere Flexibilität aufweist, kann sie sich nicht auf die Oberfläche „legen“, wodurch sie gegenüber der Fänger-DNA weiter vom Partikel entfernt ist. Dieser Effekt hat gleichzeitig einen Einfluss auf die Anbindung der Linker-DNA. Der doppelsträngige Teil des DNA-Sandwich-Komplexes bringt den einzelsträngigen Überhang weiter von der Oberfläche weg und bewirkt dadurch die weitere Verschiebung der Plasmonresonanz zu höheren Wellenlängen.

5.5.3. Biologisch relevante Anwendungsbereiche der Einzelpartikelsensorik

Das sensorische Potential der Einzelpartikelsensorik wurde anhand des *Nachweises von Pflanzenpathogen-Arten* der Gattung *Phytophthora* demonstriert. Mit Hilfe von Fänger-DNA-Sequenzen, die komplementär zur DNA der nachzuweisenden Arten waren, konnten *Phytophthora ramorum* und *Phytophthora kernoviae* über die Verschiebung der Plasmonresonanz von individuellen Goldnanopartikeln detektiert werden. Dieser Versuch zeigt dabei den deutlichen Unterschied des LSPR-Signals hinsichtlich der Basen-Komplementarität der DNA-Stränge. Während die komplementäre Analyt-DNA eine Resonanzänderung von 4-7 nm bewirkt, so zeigen die Negativkontrollen, bei denen der Fänger der jeweils anderen *Phytophthora*-Art verwendet wurde, keine signifikante Änderung der Streuspektren bzw. liegen die gemessenen Resonanzänderungen im Fehlerbereich der Messmethode.

Neben dem großen Potential für den DNA-Nachweis auf Einzelpartikelbasis konnte auch die *Detektion einer Antigen-Antikörper-Interaktion auf individuellen Goldnanopartikeln* gezeigt werden. Ein mit Antikörpern funktionalisierter Goldnanopartikel konnte ein zugehöriges Antigen über die Resonanzänderung des Transducers nachweisen. Der bekannte hydrodynamische Durchmesser der verwendeten Proteine erlaubte dabei Aussagen über die Bedeckungsdichten des Sensors mit Proteinen, da die Resonanzänderung bei Maximalbedeckung mit dem gemessenen Signal verglichen werden konnte.

5.5.4. Signalverstärkung

Die *Verstärkung des Sensorsignals* konnte durch die *Ankopplung zusätzlicher Goldnanopartikel über die Streptavidin-Biotin-Bindung* erreicht werden. Als Positivkontrolle wurde die Fänger-DNA bereits mit einem Biotinmolekül gekoppelt, wodurch die Anbindung des Streptavidin-Goldnanopartikels nicht von der erfolgreichen Hybridisierung abhängig gemacht wird. Die Änderung der Resonanzposition war für die direktmarkierte, einzelsträngige Positivkontrolle größer als nach dem Hybridisierungsschritt. Die Effizienz der Hybridisierungsreaktion aller auf dem Partikel gebundener DNA-Moleküle war dabei ausschlaggebend, wie stark sich das Signal ändert. In der Positivkontrolle waren quasi alle Fänger-Moleküle für das Sensorsignal verantwortlich, während die nicht erfolgte Anbindung des Analyten die Sensorantwort abschwächte. Die Negativkontrolle zeigte wie erwartet keine signifikante Änderung des Signals nach der Inkubation mit dem Reaktionspuffer (1 x PBS). Eventuelle Schwankungen lagen dabei im Fehlerbereich der Messung.

Für die ermittelte *Signalverstärkung von ca. 100%* konnte das im vorangegangenen Abschnitt ermittelte Detektionslimit nochmals um die Hälfte reduziert werden (auf ca. 1800 Moleküle). Der Vision des Einzelmolekülnachweises wird man allerdings mit dieser Methode auch nicht nahekommen, da die Auflösungsgrenzen der Mikrospektroskopie ab Änderungen von weniger als 0,5 nm einfach begrenzt sind. Auch die Verwendung von anderen Labeln wie beispielsweise Silberdreiecke werden dieses Limit nur wenig herabsetzen können. Andere Möglichkeiten wären hier die Anbindung von Silbernanopartikeln, die Resonanzen weit über 10 nm verschieben können [Sönnichsen 2005]. In der SPR-Sensorik wird dieses Prinzip der Signalverstärkung bereits eingesetzt, wobei auch zusätzliche Metallabscheidungen eine weitere Erhöhung der Sensorantwort bewirken können. Weiterhin wäre eine Signalverstärkung durch eine enzymatisch gesteuerte Silberabscheidung möglich, die ebenfalls eine deutliche Resonanzverschiebung erwarten lässt. Auf der einen Seite könnte hier auf das Enzym Meerrettichperoxidase zurückgegriffen werden, welches eine Abscheidung von Silber aus einer Silbersalzlösung katalysiert [Möller 2005]. Dieses Enzym lässt sich auch über die Biotin-Streptavidin-Kopplung an die DNA anbinden. Zum anderen stehen auch sogenannte DNA-Enzyme zur Verfügung, welche ähnlich der Meerrettichperoxidase eine Silberabscheidung katalysieren können. Die katalytische Aktivität wird durch die Zugabe von Hämin, das die Ausbildung sogenannter G-Quadruplex-Strukturen bewirkt, hervorgerufen [Kosman 2011].

5.5.5. Mögliche Transducer-Alternativen

Eine weitere Möglichkeit zur Signalverstärkung des hier vorgestellten Sensors wurde durch die Wahl des Signalwandlers gezeigt. Der Vergleich der Sensitivitäten und FOMs verschiedener Nanostrukturen hatte gezeigt, dass besonders *EBL-strukturierte Nanopartikel*, wie beispielsweise Nanoringe und Nanospaltringe, *sehr hohe Sensitivitäten gegenüber den chemisch synthetisierten Goldkugeln* aufweisen. Im Versuch konnten Resonanzänderungen bis zu 35 nm erreicht werden, während die Goldkugeln bei lediglich 2,6 nm lagen. Die Verwendung von Nanopartikeln, deren Form scharfe Plasmonresonanzen bedingen (z.B. Nanowürfel [Sherry 2005], Nanosterne [Nehl 2006]), aber auch die zusätzlich Metallisierung der Transducer durch die Abscheidung von dünnen Silberhüllen, zeigen ebenfalls hohe Sensitivitäten für den Nachweis von Biomolekül-Interaktionen [Park 2009, Steinbrück 2011]. Dadurch bieten sich hier besonders durch die Transducer-Wahl einige Möglichkeiten der Erweiterung des Einzelpartikelsensors für die verschiedensten biologischen Fragestellungen.

5.6. Vergleich von LSPR und SPR

Im letzten Abschnitt wurde die Einzelpartikelsensorik mit einem kommerziell angewandten, optischen Biosensor, der SPR-Spektroskopie, verglichen. Die Messergebnisse der LSPR- und SPR-Sensorik für den Nachweis von DNA-Hybridisierungen zeigten, dass die *SPRS* insgesamt zwar *um eine Zehnerpotenz sensitiver* ist, man aber bei Vergleich der Sensorfläche sieht, dass die *Zahl der tatsächlich nachgewiesenen Oligonukleotide auf Einzelpartikelebene deutlich niedriger* ist. Können auf dem SPR-Substrat etwa $1,1 \cdot 10^{11}$ DNA-Moleküle nachgewiesen werden, so sind mit einem Goldnanopartikel ca. *2100 DNA-Moleküle detektierbar* (jeweils ohne zusätzliche Signalverstärkung). Auch hier ist zu berücksichtigen, dass die tatsächliche Zahl an Molekülen auf der Oberfläche nochmals geringer ist, da immer von einer maximalen Bedeckung der Oberfläche mit Fänger-DNA ausgegangen wird.

Da andere Ansätze zur Detektion von DNA-Hybridisierungsereignissen auf Basis der (lokalisierten) Oberflächenplasmonresonanz nicht auf Einzelpartikelebene durchgeführt wurden, müssen die Ergebnisse mit Versuchen auf planaren Goldsubstraten bzw. Nanopartikel-Arrays verglichen werden. Letzterer Ansatz wurde beispielsweise mit Hilfe eines Goldnanostäbchen-Arrays in einem kürzlich erschienenen Artikel beschrieben, wobei die Konzentration der nachzuweisenden Ziel-DNA bei ca. 100 pmol/l lag [Piliarik 2012]. Ähnlich der *SPRS* wurde dieser Wert für die gesamte Fläche, und nicht für ein einzelnes Nanostäbchen, gemessen. Ein direkter Vergleich auf Einzelpartikelebene wäre hier sinnvoll, um die Sensitivitäten der Nanopartikel direkt gegenüberzustellen. Viele in der Literatur beschriebene Ansätze zum Nachweis von DNA-Hybridisierungen greifen auf die *SPRS* als Messmethode zurück. Besonders sensitiv ist das sog. SPR-Imaging und Signalverstärkung durch Goldnanopartikel. Dadurch konnten Detektionsgrenzen für die Anbindung von einzelsträngigen Oligonukleotiden von 10 pmol/l erreicht werden, wodurch sie um den Faktor 100 unter der nicht-verstärkten Variante liegen [He 2000].

Auch aus wirtschaftlicher Sicht liegt der Vorteil bei der LSPR-Sensorik. Die *Kosten* allein für das Sensorsubstrat (85 EUR je SPR-Chip; 15 EUR je Glassubstrat mit Nanopartikeln) sind *für die LSPR-Sensorik deutlich geringer*. Gleichzeitig sind die SPR-Substrate weniger robust, da kleinste Kratzer im Goldfilm die Funktionalität des Sensorchips beeinträchtigen bzw. diesen unbrauchbar machen können. Auch die Gerätekosten sprechen für den Einzelpartikelsensor, da spezielle SPR-Spektrometer bei über 100.000 EUR liegen können. Die Preise werden besonders bei Geräten für den Hochdurchsatz erreicht und sind daher für den

„normalen“ Anwender kaum erschwinglich. Hier bietet die LSPR-Sensorik auf Einzelpartikelbasis ein großes Potential, da durch die Variation von Form, Größe und Material (bzw. Materialzusammensetzung der Nanopartikel viele individuelle Sensoren, die anhand des Streuspektrums klar voneinander unterscheidbar sind, eingesetzt werden können. Die Partikelarten können sowohl in Lösung (vor der Immobilisierung auf dem Glassubstrat) als auch direkt auf dem Substrat je nach bioanalytischer Fragestellung funktionalisiert werden. Die geringe Größe dieses Sensors erlaubt zudem eine *Integration in die chipbasierte Detektionsverfahren*. Dadurch könnte vor allem eine starke *Parallelisierung* durch die gleichzeitige Detektion einer *großen Zahl von Analyten* und der *Miniaturisierung des Probenvolumens* (bis in den Attoliter-Bereich) begünstigt werden [Csaki 2011]. Erste Arbeiten zur simultanen Auswertung der optischen Eigenschaften von Nanopartikeln über die Auswertung der Streuquerschnitte von Dunkelfeldbildern [Jahr 2012 accepted] mit Hilfe eines Imaging-Spektrometers würden das parallele Auslesen der Einzelpartikelsensoren begünstigen. EBL-strukturierte Transducer könnten durch ihre hohen Sensitivitäten und FOMs eine zusätzliche Steigerung der Sensorqualität bedeuten, wodurch die Einzelpartikelsensorik andere Arten von Biosensoren klar hinter sich lassen würde.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Abbas, M. N., Abdel Fattah, A. A. und Zahran, E., *A Novel Membrane Sensor for Histamine H1-Receptor Antagonist "Fexofenadine"*, Analytical Sciences, 20 (8): 1137-1142, **2004**.
- [2] Aherne, D., Ledwith, D. M., Gara, M. und Kelly, J. M., *Optical Properties and Growth Aspects of Silver Nanoprisms Produced by a Highly Reproducible and Rapid Synthesis at Room Temperature*, Advanced Functional Materials, 18 (14): 2005-2016, **2008**.
- [3] Ahmadelinezhad, A. und Chen, A., *High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol*, Biosensors and Bioelectronics, 26 (11): 4508-4513, **2011**.
- [4] Bacia, C. L., Becker, J., Janshoff, A. und Sönnichsen, C., *Protein-Membrane Interaction Probed by Single Plasmonic Nanoparticles*, Nano Letters, 8 (6): 1724-1728, **2008**.
- [5] Beeram, S. R. und Zamborini, F. P., *Selective Attachment of Antibodies to the Edges of Gold Nanostructures for Enhanced Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing*, Journal of the American Chemical Society, 131 (33): 11689-11691, **2009**.
- [6] Binnig, G., Quate, C. F. und Gerber, C., *Atomic Force Microscope*, Physical Review Letters, 56 (9): 930, **1986**.
- [7] Bohren, C. F. und Huffman, D. R., *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, **2007**.
- [8] Brasier, C. M., Beales, P. A., Kirk, S. A., Denman, S. und Rose, J., *Phytophthora kernoviae sp nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK*, Mycological Research, 109 853-859, **2005**.
- [9] Caelen, I., Kalman, A. und Wahlström, L., *Biosensor-Based Determination of Riboflavin in Milk Samples*, Analytical Chemistry, 76 (1): 137-143, **2003**.
- [10] Cao, C. und Sim, S. J., *Resonant Rayleigh light scattering response of individual Au nanoparticles to antigen-antibody interaction*, Lab Chip, 9 (13): 1836-9, **2009**.
- [11] Chuang, Y.-C., Li, J.-C., Chen, S.-H., Liu, T.-Y., Kuo, C.-H., Huang, W.-T. und Lin, C.-S., *An optical biosensing platform for proteinase activity using gold nanoparticles*, Biomaterials, 31 (23): 6087-6095, **2010**.
- [12] Clark, L. C. und Lyons, C., *Electrode Systems For Continuous Monitoring In Cardiovascular Surgery*, Annals of the New York Academy of Sciences, 102 (1): 29-45, **1962**.
- [13] Cooper, J. C. und Hall, E. A. H., *The Nature of Biosensor Technology*, Journal of Biomedical Engineering, 10 (3): 210-219, **1988**.
- [14] Craighead, H. G. und Niklasson, G. A., *Characterization and optical properties of arrays of small gold particles*, Applied Physics Letters, 44 (12): 1134-1136, **1984**.
- [15] Csaki, A., Berg, S., Jahr, N., Leiterer, C., Schneider, T., Steinbrück, A., Zopf, D. und Fritzsche, W., *Plasmonic Nanoparticles - Noble Material for Sensoric Applications*, Nova Science Publishers, **2011**.
- [16] Danielsson, B., Gadd, K., Mattiasson, B. und Mosbach, K., *Enzyme thermistor determination of glucose in serum using immobilized glucose oxidase*, Clinica Chimica Acta, 81 (2): 163-175, **1977**.

- [17] Demers, L. M., Mirkin, C. A., Mucic, R. C., Reynolds, R. A., Letsinger, R. L., Elghanian, R. und Viswanadham, G., *A Fluorescence-Based Method for Determining the Surface Coverage and Hybridization Efficiency of Thiol-Capped Oligonucleotides Bound to Gold Thin Films and Nanoparticles*, Analytical Chemistry, 72 (22): 5535-5541, **2000**.
- [18] Dostalek, J., Homola, J. und Miler, M., *Rich information format surface plasmon resonance biosensor based on array of diffraction gratings*, Sensors and Actuators B: Chemical, 107 (1): 154-161, **2005**.
- [19] Drapp, B., Gauglitz, G., Ingenhoff, J. und Wolf, B., *Simulation of transversal modal fields in integrated optic components*, Analytica Chimica Acta, 265 (2): 267-275, **1992**.
- [20] Du, M., Yang, T. und Jiao, K., *Rapid DNA electrochemical biosensing platform for label-free potentiometric detection of DNA hybridization*, Talanta, 81 (3): 1022-1027, **2010**.
- [21] Dzyadevych, S. V., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet, C. und Jaffrezic-Renault, N., *Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors*, Analytica Chimica Acta, 568 (1-2): 248-258, **2006**.
- [22] Elghanian, R., Storhoff, J. J., Mucic, R. C., Letsinger, R. L. und Mirkin, C. A., *Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles*, Science, 277 (5329): 1078-1081, **1997**.
- [23] Endo, T., Kerman, K., Nagatani, N., Takamura, Y. und Tamiya, E., *Label-Free Detection of Peptide Nucleic Acid: DNA Hybridization Using Localized Surface Plasmon Resonance Based Optical Biosensor*, Analytical Chemistry, 77 (21): 6976-6984, **2005**.
- [24] Endo, T., Kerman, K., Nagatani, N., Hiepa, H. M., Kim, D.-K., Yonezawa, Y., Nakano, K. und Tamiya, E., *Multiple Label-Free Detection of Antigen-Antibody Reaction Using Localized Surface Plasmon Resonance-Based Core-Shell Structured Nanoparticle Layer Nanochip*, Analytical Chemistry, 78 (18): 6465-6475, **2006**.
- [25] Enfors, S.-O., *Oxygen-stabilized enzyme electrode for d-glucose analysis in fermentation broths*, Enzyme and Microbial Technology, 3 (1): 29-32, **1981**.
- [26] Englebienne, P., *Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes*, Analyst, 123 (7): 1599-1603, **1998**.
- [27] Englebienne, P., Van Hoonacker, A. und Verhas, M., *High-throughput screening using the surface plasmon resonance effect of colloidal gold nanoparticles*, Analyst, 126 (10): 1645-1651, **2001**.
- [28] Englebienne, P., Hoonacker, A. V. und Verhas, M., *Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences*, Spectroscopy, 17 (2): 255-273, **2003**.
- [29] Fägerstam, L. G., Frostell, Å., Karlsson, R., Kullman, M., Larsson, A., Malmqvist, M. und Butt, H., *Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance. Application to Epitope Mapping*, Journal of Molecular Recognition, 3 (5-6): 208-214, **1990**.
- [30] Fan, M., Thompson, M., Andrade, M. L. und Brolo, A. G., *Silver Nanoparticles on a Plastic Platform for Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing*, Analytical Chemistry, 82 (15): 6350-6352, **2010**.
- [31] Fang, Y. und Hoh, J. H., *Surface-directed DNA condensation in the absence of soluble multivalent cations*, Nucleic Acids Research, 26 (2): 588-593, **1998**.

- [32] Faraday, M., *The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 147 145-181, **1857**.
- [33] Farré, M., Martínez, E., Ramón, J., Navarro, A., Radjenovic, J., Mauriz, E., Lechuga, L., Marco, M. und Barceló, D., *Part per trillion determination of atrazine in natural water samples by a surface plasmon resonance immunosensor*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388 (1): 207-214, **2007**.
- [34] Fei, Y., Jin, X.-Y., Wu, Z.-S., Zhang, S.-B., Shen, G. und Yu, R.-Q., *Sensitive and selective DNA detection based on the combination of hairpin-type probe with endonuclease/GNP signal amplification using quartz-crystal-microbalance transduction*, Analytica Chimica Acta, 691 (1-2): 95-102, **2011**.
- [35] Forzani, E. S., Zhang, H., Chen, W. und Tao, N., *Detection of Heavy Metal Ions in Drinking Water Using a High-Resolution Differential Surface Plasmon Resonance Sensor*, Environmental Science & Technology, 39 (5): 1257-1262, **2004**.
- [36] Fotin, A. V., Drobyshchev, A. L., Proudnikov, D. Y., Perov, A. N. und Mirzabekov, A. D., *Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips*, Nucleic Acids Research, 26 (6): 1515-1521, **1998**.
- [37] Fratomico, P. M., Strobaugh, T. P., Medina, M. B. und Gehring, A. G., *Detection of Escherichia coli 0157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor*, Biotechnology Techniques, 12 (7): 571-576, **1998**.
- [38] Freeman, R., Elbaz, J., Gill, R., Zayats, M. und Willner, I., *Analysis of Dopamine and Tyrosinase Activity on Ion-Sensitive Field-Effect Transistor (ISFET) Devices*, Chemistry – A European Journal, 13 (26): 7288-7293, **2007**.
- [39] Frens, G., *Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions*, Nature, 241 20-22, **1973**.
- [40] Fuh, M. R. S., Burgess, L. W. und Christian, G. D., *Single fiber-optic fluorescence enzyme-based sensor*, Analytical Chemistry, 60 (5): 433-435, **1988**.
- [41] Gao, W., Dong, H., Lei, J., Ji, H. und Ju, H., *Signal amplification of streptavidin-horseradish peroxidase functionalized carbon nanotubes for amperometric detection of attomolar DNA*, Chemical Communications, 47 (18): 5220-5222, **2011**.
- [42] Gebauer, G., Galka, T. und Winter, J., *In situ study of surface modification of nanoparticles in reactive plasmas by Mie-ellipsometry*, **2002**.
- [43] Georgiadis, R., Peterlinz, K. P. und Peterson, A. W., *Quantitative Measurements and Modeling of Kinetics in Nucleic Acid Monolayer Films Using SPR Spectroscopy*, Journal of the American Chemical Society, 122 (13): 3166-3173, **2000**.
- [44] Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R. und Selvin, P. R., *A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry*, Analytical Biochemistry, 273 (1): 73-80, **1999**.
- [45] Gillis, E. H., Gosling, J. P., Sreenan, J. M. und Kane, M., *Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk*, Journal of Immunological Methods, 267 (2): 131-138, **2002**.
- [46] Grabar, K. C., Smith, P. C., Musick, M. D., Davis, J. A., Walter, D. G., Jackson, M. A., Guthrie, A. P. und Natan, M. J., *Kinetic Kontroll of Interparticle Spacing in Au Colloid-Based Surfaces: Rational Nanometer-Scale Architecture*, Journal of the American Chemical Society, 118 (5): 1148-1153, **1996**.
- [47] Gronewold, T. M. A., *Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: Recent trends and challenges*, Analytica Chimica Acta, 603 (2): 119-128, **2007**.

- [48] Guo, L. und Kim, D.-H., *LSPR biomolecular assay with high sensitivity induced by aptamer-antigen-antibody sandwich complex*, Biosensors and Bioelectronics, (0): **2011**.
- [49] Guthold, M., Falvo, M., Matthews, W. G., Paulson, S., Mullin, J., Lord, S., Erie, D., Washburn, S., Superfine, R., Brooks, F. P., Jr. und Taylor, R. M., 2nd, *Investigation and modification of molecular structures with the nanoManipulator*, J Mol Graph Model, 17 (3-4): 187-197, **1999**.
- [50] Haes, A. J. und Van Duyne, R. P., *A nanoscale optical biosensor: sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles*, J Am Chem Soc, 124 (35): 10596-604, **2002**.
- [51] Haes, A. J. und Van Duyne, R. P., *Nanoscale optical biosensors based on localized surface plasmon resonance spectroscopy*, SPIE, San Diego, CA, USA, **2003**.
- [52] Haes, A. J. und Duyne, R. P. V., *Preliminary studies and potential applications of localized surface plasmon resonance spectroscopy in medical diagnostics*, Expert Review of Molecular Diagnostics, 4 (4): 527-537, **2004a**.
- [53] Haes, A. J. und Van Duyne, R. P., *A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 379 (7): 920-930, **2004b**.
- [54] Haes, A. J., Chang, L., Klein, W. L. und Van Duyne, R. P., *Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor*, Journal of the American Chemical Society, 127 (7): 2264-2271, **2005**.
- [55] Hagerman, P. J., *Flexibility of DNA*, Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 17 (1): 265-286, **1988**.
- [56] Häkkinen, H., *The gold-sulfur interface at the nanoscale*, Nat Chem, 4 (6): 443-455, **2012**.
- [57] Harrington, R. E., *Flow birefringence of persistence length deoxyribonucleic acid. Hydrodynamic properties, optical anisotropy, and hydration shell anisotropy*, Journal of the American Chemical Society, 92 (23): 6957-6964, **1970**.
- [58] Haynes, C. L. und Van Duyne, R. P., *Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics*, The Journal of Physical Chemistry B, 105 (24): 5599-5611, **2001**.
- [59] He, L., Musick, M. D., Nicewarner, S. R., Salinas, F. G., Benkovic, S. J., Natan, M. J. und Keating, C. D., *Colloidal Au-Enhanced Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization*, Journal of the American Chemical Society, 122 (38): 9071-9077, **2000**.
- [60] Healy, D. A., Hayes, C. J., Leonard, P., McKenna, L. und O'Kennedy, R., *Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection*, Trends in Biotechnology, 25 (3): 125-131, **2007**.
- [61] Hernandez, F. J., Dondapati, S. K., Ozalp, V. C., Pinto, A., O'Sullivan, C. K., Klar, T. A. und Kataakis, I., *Label free optical sensor for Avidin based on single gold nanoparticles functionalized with aptamers*, Journal of Biophotonics, 2 (4): 227-231, **2009**.
- [62] Herne, T. M. und Tarlov, M. J., *Characterisation of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces*, Journal of the American Chemical Society, 119 8916-8920, **1997**.
- [63] Hirsch, L. R., Jackson, J. B., Lee, A., Halas, N. J. und West, J. L., *A Whole Blood Immunoassay Using Gold Nanoshells*, Analytical Chemistry, 75 (10): 2377-2381, **2003**.
- [64] Homola, J., *Optical fiber sensor based on surface plasmon excitation*, Sensors and Actuators B: Chemical, 29 (1-3): 401-405, **1995**.
- [65] Huang, H., Huang, S., Yuan, S., Qu, C., Chen, Y., Xu, Z., Liao, B., Zeng, Y. und Chu, P. K., *High-sensitivity biosensors fabricated by tailoring the localized surface plas-*

- mon resonance property of core-shell gold nanorods*, *Analytica Chimica Acta*, 683 (2): 242-247, **2011**.
- [66] Hwang, W. S. und Sim, S. J., *A Strategy for the Ultrasensitive Detection of Cancer Biomarkers Based on the LSPR Response of a Single AuNP*, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11 (7): 5651-5656, **2011**.
- [67] Ikariyama, Y., Furuki, M. und Aizawa, M., *Sensitive Bioaffinity Sensor with Metastable Molecular Complex Receptor and Enzyme Amplifier*, *Analytical Chemistry*, 57 (2): 496-500, **1985**.
- [68] IUPAC, *A definition of biosensors. Electrochemical biosensors: proposed definitions and classification*, *Biosensors and Bioelectronics*, 11 (4): i-vi, **1996**.
- [69] Jahr, N., Hädrich, N., Anwar, M., Csaki, A., Stranik, O. und Fritzsche, W., *Optical single-particle detection in nanoholes towards simple parallel detection of molecular binding events*, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **2012 accepted**.
- [70] Jana, N. R., Gearheart, L. und Murphy, C. J., *Seeding Growth for Size Control of 5-40 nm Diameter Gold Nanoparticles*, *Langmuir*, 17 (22): 6782-6786, **2001**.
- [71] Jayasena, S. D., *Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics*, *Clinical Chemistry*, 45 (9): 1628-1650, **1999**.
- [72] Joshi, G. K., McClory, P. J., Dolai, S. und Sardar, R., *Improved localized surface plasmon resonance biosensing sensitivity based on chemically-synthesized gold nanoprism as plasmonic transducers*, *Journal of Materials Chemistry*, 22 (3): **2012**.
- [73] Jung, L. S., Campbell, C. T., Chinowsky, T. M., Mar, M. N. und Yee, S. S., *Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films*, *Langmuir*, 14 (19): 5636-5648, **1998**.
- [74] Karlsson, R., Michaelsson, A. und Mattsson, L., *Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system*, *Journal of Immunological Methods*, 145 (1-2): 229-240, **1991**.
- [75] Kim, T. J., Cho, H. S., Park, N. Y. und Lee, J. I., *Serodiagnostic Comparison Between Two Methods, ELISA and Surface Plasmon Resonance for the Detection of Antibody Titres of Mycoplasma hyopneumoniae*, *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53 (2): 87-90, **2006**.
- [76] Knauer, A., Thete, A., Li, S., Romanus, H., Csaki, A., Fritzsche, W. und Kohler, J. M., *Au/Ag/Au double shell nanoparticles with narrow size distribution obtained by continuous micro segmented flow synthesis*, *Chemical Engineering Journal*, 166 (3): 1164-1169, **2011**.
- [77] Koh, D.-S. und Hille, B., *Modulation by neurotransmitters of catecholamine secretion from sympathetic ganglion neurons detected by amperometry*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (4): 1506-1511, **1997**.
- [78] Kosman, J. und Juskowiak, B., *Peroxidase-mimicking DNAzymes for biosensing applications: A review*, *Analytica Chimica Acta*, 707 (1-2): 7-17, **2011**.
- [79] Kreibig, U. und Vollmer, M., *Optical Properties of Metal Clusters*, Berlin, **1995**.
- [80] Kretschmann, E. und Raether, H., *Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light*, *Z. Naturforsch. A*, 23 2135, **1968**.
- [81] Kvasnička, P. und Homola, J., *Optical sensors based on spectroscopy of localized surface plasmons on metallic nanoparticles: Sensitivity considerations*, *Biointerphases*, 3 (3): FD4-FD11, **2008**.
- [82] Ladd, J., Boozer, C., Yu, Q., Chen, S., Homola, J. und Jiang, S., *DNA-Directed Protein Immobilization on Mixed Self-Assembled Monolayers via a Streptavidin Bridge*, *Langmuir*, 20 (19): 8090-8095, **2004**.

- [83] Lazarides, A. A. und Schatz, G. C., *DNA-linked metal nanosphere materials: Fourier-transform solutions for the optical response*, Journal of Chemical Physics, 112 (6): 2987-2994, **2000**.
- [84] Lee, S.-R., Sawada, K., Takao, H. und Ishida, M., *An enhanced glucose biosensor using charge transfer techniques*, Biosensors and Bioelectronics, 24 (4): 650-656, **2008**.
- [85] Levicky, R., Herne, T. M., Tarlov, M. J. und Satija, S. K., *Using Self-Assembly To Control the structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study*, Journal of the American Chemical Society, 120 9787-9792, **1998**.
- [86] Liedberg, B., Nylander, C. und Lundström, I., *Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing*, Sensors and Actuators, 4 (0): 299-304, **1983**.
- [87] Liedberg, B., Lundström, I. und Stenberg, E., *Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance*, Sensors and Actuators B: Chemical, 11 (1-3): 63-72, **1993**.
- [88] Liedberg, B., Nylander, C. und Lundström, I., *Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started*, Biosensors and Bioelectronics, 10 (8): i-ix, **1995**.
- [89] Liehr, T., Thoma, K., Kammler K., Gehring C., Ekici A, Bathke KD und ., G. H. e. a., *Direct preparation of uncultured EDTA-treated or heparinized blood for interphase FISH analysis*, Applied Cytogenetics, 21 185-188, **1995**.
- [90] Lukosz, W., *Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing*, Biosensors and Bioelectronics, 6 (3): 215-225, **1991**.
- [91] Lukosz, W., *Integrated-optical and surface-plasmon sensors for direct affinity sensing. Part II: Anisotropy of adsorbed or bound protein adlayers*, Biosensors and Bioelectronics, 12 (3): 175-184, **1997**.
- [92] Maliwal, B. P., Kuśba, J. und Lakowicz, J. R., *Fluorescence energy transfer in one dimension: Frequency-domain fluorescence study of DNA-fluorophore complexes*, Biopolymers, 35 (2): 245-255, **1995**.
- [93] Maxwell, J. C., *A Treatise on Electricity and Magnetism*, Clarendon Press, Oxford, **1873**.
- [94] Mayer, K. M. und et al., *A single molecule immunoassay by localized surface plasmon resonance*, Nanotechnology, 21 (25): 255503, **2010**.
- [95] McFarland, A. D. und Van Duyne, R. P., *Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity*, Nano Letters, 3 (8): 1057-1062, **2003**.
- [96] Mie, G., *Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen*, Annalen der Physik, 330 (3): 377-445, **1908**.
- [97] Miranda, A., Malheiro, E., Skiba, E., Quaresma, P., Carvalho, P. A., Eaton, P., de Castro, B., Shelnutt, J. A. und Pereira, E., *One-pot synthesis of triangular gold nanoplates allowing broad and fine tuning of edge length*, Nanoscale, 2 (10): 2209-2216, **2010**.
- [98] Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C. und Storhoff, J. J., *A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials*, Nature, 382 (6592): 607-609, **1996**.
- [99] Mishra, G. K., Mishra, R. K. und Bhand, S., *Flow injection analysis biosensor for urea analysis in adulterated milk using enzyme thermistor*, Biosensors and Bioelectronics, 26 (4): 1560-1564, **2010**.
- [100] Mock, J. J., Barbic, M., Smith, D. R., Schultz, D. A. und Schultz, S., *Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles*, The Journal of Chemical Physics, 116 (15): 6755-6759, **2002**.

- [101] Mock, J. J., Smith, D. R. und Schultz, S., *Local Refractive Index Dependence of Plasmon Resonance Spectra from Individual Nanoparticles*, Nano Lett., 3 (4): 485-491, **2003**.
- [102] Mohammed, I., Mullett, W. M., Lai, E. P. C. und Yeung, J. M., *Is biosensor a viable method for food allergen detection?*, Analytica Chimica Acta, 444 (1): 97-102, **2001**.
- [103] Möller, R., Powell, R. D., Hainfeld, J. F. und Fritzsche, W., *Enzymatic Control of Metal Deposition as Key Step for a Low-Background Electrical Detection for DNA Chips*, Nano Letters, 5 (7): 1475-1482, **2005**.
- [104] Mullett, W. M., Lai, E. P. C. und Yeung, J. M., *Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays*, Methods, 22 (1): 77-91, **2000**.
- [105] Mulvaney, P., *Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles*, Langmuir, 12 (3): 788-800, **1996**.
- [106] Nedelkov, D., Rasooly, A. und Nelson, R. W., *Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food*, International Journal of Food Microbiology, 60 (1): 1-13, **2000**.
- [107] Nehl, C. L., Grady, N. K., Goodrich, G. P., Tam, F., Halas, N. J. und Hafner, J. H., *Scattering Spectra of Single Gold Nanoshells*, Nano Letters, 4 (12): 2355-2359, **2004**.
- [108] Nehl, C. L., Liao, H. und Hafner, J. H., *Optical Properties of Star-Shaped Gold Nanoparticles*, Nano Letters, 6 (4): 683-688, **2006**.
- [109] Niemeyer, C. M., *Nanopartikel, Proteine und Nucleinsäuren: Die Biotechnologie begegnet den Materialwissenschaften*, Angewandte Chemie, 113 (22): 4254-4287, **2001**.
- [110] Novo, C., Funston, A. M. und Mulvaney, P., *Direct observation of chemical reactions on single gold nanocrystals using surface plasmon spectroscopy*, Nat Nano, 3 (10): 598-602, **2008**.
- [111] Nusz, G. J., Marinakos, S. M., Curry, A. C., Dahlin, A., Hook, F., Wax, A. und Chilkoti, A., *Label-free plasmonic detection of biomolecular binding by a single gold nanorod*, Anal Chem, 80 (4): 984-9, **2008**.
- [112] Nylander, C., Liedberg, B. und Lind, T., *Gas detection by means of surface plasmon resonance*, Sensors and Actuators, 3 (0): 79-88, **1982**.
- [113] Ock, K., Jang, G., Roh, Y., Kim, S., Kim, J. und Koh, K., *Optical detection of Cu²⁺ ion using a SQ-dye containing polymeric thin-film on Au surface*, Microchemical Journal, 70 (3): 301-305, **2001**.
- [114] Okafor, C., Grooms, D., Alocilja, E. und Bolin, S., *Fabrication of a Novel Conductometric Biosensor for Detecting Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Antibodies*, Sensors, 8 (9): 6015-6025, **2008**.
- [115] Otto, A., *Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection*, Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 216 (4): 398-410, **1968**.
- [116] Park, K. H., Kim, S., Yang, S.-M. und Park, H. G., *Detection of DNA Immobilization and Hybridization on Gold/Silver Nanostructures Using Localized Surface Plasmon Resonance*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 9 (2): 1374-1378, **2009**.
- [117] Pease, R. F. W., *Electron beam lithography*, Contemporary Physics, 22 (3): 265-290, **1981**.
- [118] Peterlinz, K. A., Georgiadis, R. M., Herne, T. M. und Tarlov, M. J., *Observation of Hybridization and Dehybridization of Thiol-Tethered DNA Using Two-Color Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*, Journal of the American Chemical Society, 119 (14): 3401-3402, **1997**.

- [119] Piliarik, M., Sípová, H., Kvasnicka, P., Galler, N., Krenn, J. R. und Homola, J., *High-resolution biosensor based on localized surface plasmons*, Opt. Express, 20 (1): 672-680, **2012**.
- [120] Pizziconi, V. B. und Page, D. L., *A cell-based immunobiosensor with engineered molecular recognition Part I: design feasibility*, Biosensors and Bioelectronics, 12 (4): 287-299, **1997**.
- [121] Pollet, J., Delpont, F., Janssen, K. P. F., Tran, D. T., Wouters, J., Verbiest, T. und Lammertyn, J., *Fast and accurate peanut allergen detection with nanobead enhanced optical fiber SPR biosensor*, Talanta, 83 (5): 1436-1441, **2011**.
- [122] Rahni, N., Mohammad, A., Guilbault, G. G. und De Olivera Neto, G., *Immobilized enzyme electrode for the determination of oxalate in urine*, Analytical Chemistry, 58 (3): 523-526, **1986**.
- [123] Ramanathan, K. und Danielsson, B., *Principles and applications of thermal biosensors*, Biosensors and Bioelectronics, 16 (6): 417-423, **2001**.
- [124] Raschke, G., Kowarik, S., Franzl, T., Sonnichsen, K., Klar, T. A., Feldmann, J., Nichtl, A. und Kurzinger, K., *Biomolecular Recognition Based on Single Gold Nanoparticle Light Scattering*, Nano Letters, 3 (7): 935-938, **2003**.
- [125] Raschke, G., *Molekulare Erkennung mit einzelnen Gold-Nanopartikeln*, Dissertation. LMU München: Fakultät für Physik, **2005**.
- [126] Riboh, J. C., Haes, A. J., McFarland, A. D., Ranjit Yonzon, C. und Van Duyne, R. P., *A Nanoscale Optical Biosensor: Real-Time Immunoassay in Physiological Buffer Enabled by Improved Nanoparticle Adhesion*, The Journal of Physical Chemistry B, 107 (8): 1772-1780, **2003**.
- [127] Ritchie, R. H., *Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films*, Physical Review, 106 (5): 874-881, **1957**.
- [128] Rizzo, D. M., Garbelotto, M., Davidson, J. M., Slaughter, G. W. und Koike, S. T., *Phytophthora ramorum as the cause of extensive mortality of Quercus spp. and Lithocarpus densiflorus in California*, Plant Disease, 86 (3): 205-214, **2002**.
- [129] Rojo, N., Ercilla, G. und Haro, I., *GB Virus C (GBV-C) / Hepatitis G Virus (HGV): Towards the Design of Synthetic Peptides-based Biosensors for Immunodiagnosis of GBV-C / HGV Infection*, Current Protein and Peptide Science, 4 (4): 291-298, **2003**.
- [130] Rosi, N. L. und Mirkin, C. A., *Nanostructures in Biodiagnostics*, Chemical Reviews, 105 (4): 1547-1562, **2005**.
- [131] Sannomiya, T., Hafner, C. und Voros, J., *In situ Sensing of Single Binding Events by Localized Surface Plasmon Resonance*, Nano Letters, 8 (10): 3450-3455, **2008**.
- [132] Scarano, S., Ermini, M. L., Spiriti, M. M., Mascini, M., Bogani, P. und Minunni, M., *Simultaneous Detection of Transgenic DNA by Surface Plasmon Resonance Imaging with Potential Application to Gene Doping Detection*, Analytical Chemistry, 83 (16): 6245-6253, **2011**.
- [133] Sheikh, S., Blaszykowski, C. und Thompson, M., *Label-free detection of HIV-2 antibodies in serum with an ultra-high frequency acoustic wave sensor*, Talanta, 85 (1): 816-819, **2011**.
- [134] Sherry, L. J., Chang, S.-H., Schatz, G. C., Van Duyne, R. P., Wiley, B. J. und Xia, Y., *Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Nanocubes*, Nano Letters, 5 (10): 2034-2038, **2005**.
- [135] Sherry, L. J., Jin, R., Mirkin, C. A., Schatz, G. C. und Van Duyne, R. P., *Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Triangular Nanoprisms*, Nano Letters, 6 (9): 2060-2065, **2006**.

- [136] Shi, W. und Ma, Z., *A novel label-free amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen based on redox membrane*, Biosensors and Bioelectronics, 26 (6): 3068-3071, **2011**.
- [137] Soh, Nobuaki, Watanabe, Tomomi, Asano, Yasukazu, Imato und Toshihiko, *Indirect competitive immunoassay for bisphenol A, based on a surface plasmon resonance sensor*, Myu, Tokyo, JAPON, **2003**.
- [138] Soldatkin, O. O., Kucherenko, I. S., Pyeshkova, V. M., Kukla, A. L., Jaffrezic-Renault, N., El'skaya, A. V., Dzyadevych, S. V. und Soldatkin, A. P., *Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions*, Bioelectrochemistry, (0): **2011**.
- [139] Sönnichsen, C., Geier, S., Hecker, N. E., Plessen, G. v., Feldmann, J., Dittlbacher, H., Lamprecht, B., Krenn, J. R., Aussenegg, F. R., Chan, V. Z. H., Spatz, J. P. und Möller, M., *Spectroscopy of single metallic nanoparticles using total internal reflection microscopy*, AIP, **2000**.
- [140] Sönnichsen, C., *Plasmons in metal nanostructures*, Dissertation. LMU München: Fakultät für Physik, **2001**.
- [141] Sönnichsen, C., Franzl, T., Wilk, T., von Plessen, G., Feldmann, J., Wilson, O. und Mulvaney, P., *Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods*, Phys Rev Lett, 88 (7): 077402, **2002**.
- [142] Sönnichsen, C., Reinhard, B. M., Liphardt, J. und Alivisatos, A. P., *A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles*, Nat Biotechnol, 23 741 - 745, **2005**.
- [143] Squire, P. G. und Himmel, M. E., *Hydrodynamics and protein hydration*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 196 (1): 165-177, **1979**.
- [144] Steel, A. B., Levicky, R. L., Herne, T. M. und Tarlov, M. J., *Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly*, Biophys J, 79 (2): 975-81, **2000**.
- [145] Steinbrück, A., Stranik, O., Csaki, A. und Fritzsche, W., *Sensoric potential of gold-silver core-shell nanoparticles*, Analytical & Bioanalytical Chemistry, **2011**.
- [146] Steiner, G. und Salzer, R., *Biosensors based on SPR Imaging*, Universitätsbibliothek Tübingen, Tübingen, **2002**.
- [147] Storhoff, J. J., Lazarides, A. A., Mucic, R. C., Mirkin, C. A., Letsinger, R. L. und Schatz, G. C., *What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies?*, Journal of the American Chemical Society, 122 (19): 4640-4650, **2000**.
- [148] Tinland, B., Pluen, A., Sturm, J. und Weill, G., *Persistence Length of Single-Stranded DNA*, Macromolecules, 30 (19): 5763-5765, **1997**.
- [149] Trettnak, W., Leiner, M. J. P. und Wolfbeis, O. S., *Fibre-optic glucose sensor with a pH optrode as the transducer*, Biosensors, 4 (1): 15-26, **1989**.
- [150] Turkevich, J., Stevenson, P. C. und Hillier, J., *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*, Discussions of the Faraday Society, 11 55-75, **1951**.
- [151] Ulman, A., *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press, Boston, **1991**.
- [152] Vaisocherova, H., Mrkvova, K., Pilarik, M., Jinoch, P., Steinbachova, M. und Homola, J., *Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein-Barr virus*, Biosensors and Bioelectronics, 22 (6): 1020-1026, **2007**.

- [153] van Gent, J., Lambeck, P. V., Kreuwel, H. J. M., Gerritsma, G. J., Sudhölter, E. J. R., Reinhoudt, D. N. und Popma, T. J. A., *Optimization of a chemooptical surface plasmon resonance based sensor*, Appl. Opt., 29 (19): 2843-2849, **1990**.
- [154] Wang, Z., Wilkop, T., Xu, D., Dong, Y., Ma, G. und Cheng, Q., *Surface plasmon resonance imaging for affinity analysis of aptamer-protein interactions with PDMS microfluidic chips*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389 (3): 819-825, **2007**.
- [155] Wangsa, J. und Arnold, M. A., *Fiber-optic biosensors based on the fluorometric detection of reduced nicotinamide adenine dinucleotide*, Analytical Chemistry, 60 (10): 1080-1082, **1988**.
- [156] Wei, J., Mu, Y., Song, D., Fang, X., Liu, X., Bu, L., Zhang, H., Zhang, G., Ding, J., Wang, W., Jin, Q. und Luo, G., *A novel sandwich immunosensing method for measuring cardiac troponin I in sera*, Analytical Biochemistry, 321 (2): 209-216, **2003**.
- [157] Whitesides, G. M. und Laibinis, P. E., *Wet chemical approaches to the characterization of organic surfaces: self-assembled monolayers, wetting, and the physical-organic chemistry of the solid-liquid interface*, Langmuir, 6 (1): 87-96, **1990**.
- [158] Win, M. N., Klein, J. S. und Smolke, C. D., *Codeine-binding RNA aptamers and rapid determination of their binding constants using a direct coupling surface plasmon resonance assay*, Nucleic Acids Research, 34 (19): 5670-5682, **2006**.
- [159] Wittekindt, C., Fleckenstein, B., Wiesmüller, K.-H., Eing, B. R. und Kühn, J. E., *Detection of human serum antibodies against type-specifically reactive peptides from the N-terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 and type 2 by surface plasmon resonance*, Journal of Virological Methods, 87 (1-2): 133-144, **2000**.
- [160] Xia, Y., Huang, W., Zheng, J., Niu, Z. und Li, Z., *Nonenzymatic amperometric response of glucose on a nanoporous gold film electrode fabricated by a rapid and simple electrochemical method*, Biosensors and Bioelectronics, 26 (8): 3555-3561, **2011**.
- [161] Yonzon, C. R., Stuart, D. A., Zhang, X., McFarland, A. D., Haynes, C. L. und Van Duyne, R. P., *Towards advanced chemical and biological nanosensors-An overview*, Talanta, 67 (3): 438-48, **2005**.
- [162] Zhang, Y., Wang, H., Yan, B., Zhang, Y., Li, J., Shen, G. und Yu, R., *A reusable piezoelectric immunosensor using antibody-adsorbed magnetic nanocomposite*, Journal of Immunological Methods, 332 (1-2): 103-111, **2008**.

A - Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABS	Absorption
AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>engl. atomic force microscope</i>)
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
Au	Gold
B	Biotin
BIA	Biomolekulare Interaktionsanalyse (<i>engl. biomolecular interaction analysis</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl. bovine serum albumin</i>)
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (<i>engl. charge-coupled device</i>)
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. deoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid
EHEC	Enterohämorrhagisches Escherichia coli
EXT	Extinktion
FOM	Gütefaktor (<i>engl. figure of merit</i>)
G	Guanin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>engl. high-performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>engl. horseradish peroxidase</i>)
IPHT	Institut für Photonische Technologien
ITO	Indiumzinnoxid (<i>engl. indium tin oxide</i>)
LED	lichtemittierende Diode

LSPR	lokalisierte Oberflächenplasmonresonanz (<i>engl. localized surface plasmon resonance</i>)
M	Molarität (mol/l)
MCH	6-Mercaptohexanol
Med.	Medium
MKS	Maul- und Klauenseuche
MUA	Merkaptoundekansäure (<i>engl. mercaptoundecanoic acid</i>)
NA	Numerische Apertur
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NSL	Nanokugellithographie (<i>engl. nanosphere lithography</i>)
PBS	Phosphatpuffer (<i>engl. phosphate buffered saline</i>)
PMMA	Polymethylmethacrylat
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage (<i>engl. quartz crystal microbalance</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIU	Brechungsindexeinheit (<i>engl. refractive index unit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl. ribonucleic acid</i>)
SA	Streptavidin
SAM	Selbstorganisierende Monolage (<i>engl. self-assembled monolayer</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>)
SP	Oberflächenplasmon (<i>engl. surface plasmon</i>)
SPP	Oberflächenplasmonpolariton (<i>engl. surface plasmon polariton</i>)
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (<i>engl. surface plasmon resonance</i>)
SSC	Natriumzitratpuffer (<i>engl. sodium salt citrat</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA
STR	Streuung
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TIR	Totale interne Reflexion (<i>engl. total internal reflection</i>)
UV-Vis	ultravioletter und sichtbarer Spektralbereich (<i>engl. ultraviolet-visible</i>)
w. E.	willkürliche Einheiten

B - Mie-Theorie für Schalenpartikel

MatLab-Programm: Interface und graphische Darstellung

(die Programmierung erfolgte durch Dr. Ondrej Stranik, IPHT Jena)

```
function varargout = LSPR_CSNP(varargin)
% LSPR_CSNP M-file for LSPR_CSNP.fig
%   LSPR_CSNP, by itself, creates a new LSPR_CSNP or raises the existing
%   singleton*.
%
%   H = LSPR_CSNP returns the handle to a new LSPR_CSNP or the handle to
%   the existing singleton*.
%
%   LSPR_CSNP('CALLBACK',hObject,eventData,handles,...) calls the local
%   function named CALLBACK in LSPR_CSNP.M with the given input arguments.
%
%   LSPR_CSNP('Property','Value',...) creates a new LSPR_CSNP or raises the
%   existing singleton*. Starting from the left, property value pairs are
%   applied to the GUI before LSPR_CSNP_OpeningFunction gets called. An
%   unrecognized property name or invalid value makes property application
%   stop. All inputs are passed to LSPR_CSNP_OpeningFcn via varargin.
%
%   *See GUI Options on GUIDE's Tools menu. Choose "GUI allows only one
%   instance to run (singleton)".
%
% See also: GUIDE, GUIDATA, GUIHANDLES

% Edit the above text to modify the response to help LSPR_CSNP

% Last Modified by GUIDE v2.5 04-May-2011 17:50:45

% Begin initialization code - DO NOT EDIT
gui_Singleton = 1;
gui_State = struct('gui_Name',    mfilename, ...
    'gui_Singleton', gui_Singleton, ...
    'gui_OpeningFcn', @LSPR_CSNP_OpeningFcn, ...
    'gui_OutputFcn', @LSPR_CSNP_OutputFcn, ...
    'gui_LayoutFcn', [] , ...
    'gui_Callback', []);
if nargin && ischar(varargin{1})
    gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
end

if nargout
    [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{1});
else
```



```
gui_mainfcn(gui_State, varargin[Gebauer]);
end
% End initialization code - DO NOT EDIT

% --- Executes just before LSPR_CSNP is made visible.
function LSPR_CSNP_OpeningFcn(hObject, eventdata, handles, varargin)
% This function has no output args, see OutputFcn.
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% varargin   command line arguments to LSPR_CSNP (see VARARGIN)
% Choose default command line output for LSPR_CSNP
handles.output = hObject;
for ii=1:10
    handles.array(ii).a = 0;
    handles.array(ii).r = 30;
    handles.array(ii).s = 10;
    handles.array(ii).nc = 2;
    handles.array(ii).ncm = 1;
    handles.array(ii).ns = 3;
    handles.array(ii).nsm = 1.6;
    handles.array(ii).ne = 1;
    handles.array(ii).nem = 1;
end;
handles.ew= [];
handles.ec = [];
set(handles.file_name,'String','');

handles.w = 300:900;

% read n,k of Ag,Au
c= 2.998*10^8;
h= 4.136*10^-15;
fid = fopen('1972 Johnson - silver.dat');
fgetl(fid);fgetl(fid);
cc = fscanf(fid, '%g %g %g', [3 inf]);
handles.Ag=cc;
fclose(fid);
handles.Ag(:,1)=10^9*h*c./handles.Ag(:,1);
fid = fopen('1972 Johnson - gold.dat');
fgetl(fid);fgetl(fid);
cc = fscanf(fid, '%g %g %g', [3 inf]);
handles.Au=cc;
fclose(fid);
handles.Au(:,1)=10^9*h*c./handles.Au(:,1);
% end of reading refractive indexes

spnumber_Callback(hObject, eventdata, handles);
```

```
% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% UIWAIT makes LSPR_CSNP wait for user response (see UIRESUME)
% uiwait(handles.figure1);

% --- Outputs from this function are returned to the command line.
function varargout = LSPR_CSNP_OutputFcn(hObject, eventdata, handles)
% varargout cell array for returning output args (see VARARGOUT);
% hObject handle to figure
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Get default command line output from handles structure
varargout[1] = handles.output;

% --- Executes on selection change in spnumber.
function spnumber_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to spnumber (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: contents = get(hObject,'String') returns spnumber contents as cell array
% contents{get(hObject,'Value')} returns selected item from spnumber

ii = get(handles.spnumber,'Value');

set(handles.active,'Value',handles.array(ii).a);
set(handles.radius,'String',num2str(handles.array(ii).r));
set(handles.shell,'String',num2str(handles.array(ii).s));
set(handles.ncore,'Value',handles.array(ii).nc);
set(handles.mncore,'String',num2str(handles.array(ii).ncm));
set(handles.nshell,'Value',handles.array(ii).ns);
set(handles.mnshell,'String',num2str(handles.array(ii).nsm));
set(handles.nmedium,'Value',handles.array(ii).ne);
set(handles.mnmedium,'String',num2str(handles.array(ii).nem));
% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function spnumber_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to spnumber (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: listbox controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
```

```
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on button press in active.
function active_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to active (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hint: get(hObject,'Value') returns toggle state of active

handles.array(get(handles.spnumber,'Value')).a = get(hObject,'Value');
    % Update handles structure
guidata(hObject, handles);

function radius_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to radius (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of radius as text
%        str2double(get(hObject,'String')) returns contents of radius as a double

handles.array(get(handles.spnumber,'Value')).r = str2double(get(hObject,'String'));
    % Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function radius_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to radius (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%        See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function shell_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to shell (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of shell as text
%        str2double(get(hObject,'String')) returns contents of shell as a double
handles.array(get(handles.spnumber,'Value')).s = str2double(get(hObject,'String'));
    % Update handles structure
```

```
guidata(hObject, handles);

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function shell_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to shell (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on selection change in ncore.
function ncore_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to ncore (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: contents = get(hObject,'String') returns ncore contents as cell array
%       contents{get(hObject,'Value')} returns selected item from ncore
handles.array(get(handles.spnumber,'Value')).nc = get(hObject,'Value');
% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function ncore_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to ncore (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: popupmenu controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on selection change in nshell.
function nshell_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to nshell (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: contents = get(hObject,'String') returns nshell contents as cell array
%       contents{get(hObject,'Value')} returns selected item from nshell
handles.array(get(handles.spnumber,'Value')).ns = get(hObject,'Value');
```

```
% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function nshell_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to nshell (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: popupmenu controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function mncore_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to mncore (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of mncore as text
%       str2double(get(hObject,'String')) returns contents of mncore as a double

handles.array(get(handles.spnumber,'Value')).ncm = str2double(get(hObject,'String'));
% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function mncore_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to mncore (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function mnshell_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to mnshell (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of mnshell as text
%       str2double(get(hObject,'String')) returns contents of mnshell as a double
handles.array(get(handles.spnumber,'Value')).nsm = str2double(get(hObject,'String'));
```

```
% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function mnshell_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to mnshell (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on selection change in nmedium.
function nmedium_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to nmedium (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: contents = get(hObject,'String') returns nmedium contents as cell array
%       contents{get(hObject,'Value')} returns selected item from nmedium
handles.array(get(handles.spnumber,'Value')).ne = get(hObject,'Value');
% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function nmedium_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to nmedium (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: popupmenu controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function mnmedium_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to mnmedium (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of mnmedium as text
%       str2double(get(hObject,'String')) returns contents of mnmedium as a double
handles.array(get(handles.spnumber,'Value')).nem = str2double(get(hObject,'String'));
```

```
% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function mnmedium_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to mnmedium (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on button press in calculate.
function calculate_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to calculate (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

%
Ag = spline(handles.Ag(:,1),handles.Ag(:,2),handles.w)'+ ...
    i*spline(handles.Ag(:,1),handles.Ag(:,3),handles.w)';
Au = spline(handles.Au(:,1),handles.Au(:,2),handles.w)'+ ...
    i*spline(handles.Au(:,1),handles.Au(:,3),handles.w)';

%figure(1);
%plot(handles.w,real(Ag),handles.w,imag(Ag),handles.w,real(Au),handles.w,imag(Au));
%hold on;
%plot(handles.Ag(:,1),handles.Ag(:,2),'*',handles.Ag(:,1),handles.Ag(:,3),'*', ...
%     handles.Au(:,1),handles.Au(:,2),'*',handles.Au(:,1),handles.Au(:,3),'*');

for ii=1:10
    if handles.array(ii).a == 1
        ref = handles.w';
        switch handles.array(ii).nc
            case [Liehr]
                ref = [ref, Ag];
            case [Guthold]
                ref = [ref, Au];
            otherwise
                ref = [ref, handles.array(ii).ncm*ones(length(handles.w),1)];
        end
        switch handles.array(ii).ns
            case [Liehr]
                ref = [ref, Ag];
            case [Guthold]
```

```

        ref = [ref, Au];
        otherwise
            ref = [ref, handles.array(ii).nsm*ones(length(handles.w),1)];
    end
    Nout=0;
    switch handles.array(ii).ne
    case [Liehr]
        Nout = 1;
    case [Guthold]
        Nout = 1.33
    otherwise
        Nout = handles.array(ii).nem;
    end
    % get spectra
    mat = C_coresell(ref,Nout,handles.array(ii).r,handles.array(ii).s,50);
    handles.array(ii).c = mat(:,get(handles.values,'Value')+1)*...
        (pi*(handles.array(ii).r+handles.array(ii).s)^2);

    %axes(handles.spectra);

    figure(2);
    hold on;
    plot(handles.w,handles.array(ii).c);
    axis([handles.w(1) handles.w(end) -inf inf]);
    axis manual;
    xlabel('wavelength [nm]');
    ylabel(' cross section [nm^2]');
    end
end

if ~isequal(handles.file_name,0)
    figure(2);
    hold on;
    ax1 = gca;
    ax2 = axes('Position',get(ax1,'Position'),...
        'XAxisLocation','bottom',...
        'YAxisLocation','right',...
        'Visible','off');
    hl2 = line(handles.ew,handles.ec,'Color','k','Marker','*','Parent',ax2);
    axis(ax2,[handles.w(1) handles.w(end) -inf inf]);
    end;

    % Update handles structure
    guidata(hObject, handles);

    % --- Executes on selection change in values.
    function values_Callback(hObject, eventdata, handles)
    % hObject    handle to values (see GCBO)
    % eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB

```

```
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: contents = get(hObject,'String') returns values contents as cell array
%         contents {get(hObject,'Value')} returns selected item from values

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function values_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to values (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: popupmenu controls usually have a white background on Windows.
%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on button press in all.
function all_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to all (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

jj= get(handles.spnumber,'Value');
inc = (str2double(get(handles.pos2,'String'))-str2double(get(handles.pos1,'String')))/(10-jj);
pos = str2double(get(handles.pos1,'String'));

for ii=jj:10
    handles.array(ii).a = handles.array(jj).a;
    handles.array(ii).r = handles.array(jj).r;
    handles.array(ii).s = handles.array(jj).s;
    handles.array(ii).nc = handles.array(jj).nc;
    handles.array(ii).ncm = handles.array(jj).ncm;
    handles.array(ii).ns = handles.array(jj).ns;
    handles.array(ii).nsm = handles.array(jj).nsm;
    handles.array(ii).ne = handles.array(jj).ne;
    handles.array(ii).nem = handles.array(jj).nem;

switch get(handles.var,'Value')
    case [Liehr]
        handles.array(ii).r= pos;
    case [Guthold]
        handles.array(ii).s= pos;
    case {3}
        handles.array(ii).ncm= pos;handles.array(ii).nc=3;
    case {4}
        handles.array(ii).nsm= pos;handles.array(ii).ns=3;
    case [Liehr]
```

```
        handles.array(ii).nem= pos;handles.array(ii).ne=3;
    end;
    pos =pos + inc;
end;

spnnumber_Callback(hObject, eventdata, handles);

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% --- Executes on selection change in var.
function var_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to var (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: contents = get(hObject,'String') returns var contents as cell array
%        contents{get(hObject,'Value')} returns selected item from var

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function var_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to var (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: popupmenu controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function pos1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to pos1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of pos1 as text
%        str2double(get(hObject,'String')) returns contents of pos1 as a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function pos1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to pos1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
```

```
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end
function pos2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to pos2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of pos2 as text
%        str2double(get(hObject,'String')) returns contents of pos2 as a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function pos2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to pos2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%        See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end
% --- Executes on button press in export_data.
function export_data_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to export_data (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

[file,path] = uiputfile('results.txt','Save file name');
for ii=1:10
    if handles.array(ii).a == 1
        fid = fopen([path '/' int2str(ii) file ], 'wt');
        fprintf(fid, 'simulated data for\n');
        switch handles.array(ii).nc
            case [Liehr]
                fprintf(fid, 'Silver core\n');
            case [Guthold]
                fprintf(fid, 'Gold core\n');
            otherwise
                fprintf(fid, 'core refractive index n= %f\n',handles.array(ii).ncm);
        end
        switch handles.array(ii).ns
            case [Liehr]
                fprintf(fid, 'Silver shell\n');
            case [Guthold]
                fprintf(fid, 'Gold shell\n');
```

```
        otherwise
        fprintf(fid, 'shell refractive index n= %f\n', handles.array(ii).nsm);
        end
        switch handles.array(ii).ne
        case [Liehr]
        fprintf(fid, 'embedded medium air\n');
        case [Guthold]
        fprintf(fid, 'embedded medium water\n');
        otherwise
        fprintf(fid, 'embedded medium n = %f\n', handles.nem);
        end
        fprintf(fid, 'radius core r= %f nm\n', handles.array(ii).r);
        fprintf(fid, 'shell thickness s= %f nm\n', handles.array(ii).s);
        switch handles.values
        case [Liehr]
        fprintf(fid, 'Cext\n');
        case [Guthold]
        fprintf(fid, 'Csca\n');
        otherwise
        fprintf(fid, 'Cabs\n');
        end
        fprintf(fid, '%f %f\n', [ handles.w; handles.array(ii).c]);
        fclose(fid)
    end
end
% --- Executes on button press in import.
function import_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to import (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

[FileName, PathName] = uigetfile('*.','Select experimental data');

fid = fopen([PathName '/' FileName], 'r');
if isequal(FileName, 0)
    handles.ew = [];
    handles.ec = [];
    set(handles.file_name, 'String', '');
else
    a = fscanf(fid, '%g %g', [2 inf]);
    handles.ew = a(1,:);
    handles.ec = a(2,:);
    fclose(fid)
    set(handles.file_name, 'String', FileName);
end

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);
```

C - Dielektrische Funktion von Gold

Für Berechnungen von Anhang B:

Energy (eV)	n	k
1.02	0.35	8.145
1.14	0.27	7.150
1.26	0.22	6.350
1.39	0.17	5.663
1.51	0.16	5.083
1.64	0.14	4.542
1.76	0.13	4.103
1.88	0.14	3.697
2.01	0.21	3.272
2.13	0.29	2.863
2.26	0.43	2.455
2.38	0.62	2.081
2.50	1.04	1.833
2.63	1.31	1.849
2.75	1.38	1.914
2.88	1.45	1.948
3.00	1.46	1.958
3.12	1.47	1.952
3.25	1.46	1.933
3.37	1.48	1.895
3.50	1.50	1.866
3.62	1.48	1.871
3.74	1.48	1.883
3.87	1.54	1.898
3.99	1.53	1.893
4.12	1.53	1.889
4.24	1.49	1.878
4.36	1.47	1.869
4.49	1.43	1.847
4.61	1.38	1.803
4.74	1.35	1.749
4.86	1.33	1.688
4.98	1.33	1.631
5.11	1.32	1.577

D - Chemikalienliste

Name	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
1,4-Dithiothreitol	für Molekularbiologie, zur Analyse	Roth
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid	$\geq 99\%$ (AT)	Sigma
6-Mercaptohexanol	reinst., $> 97\%$	Merck
11-Mercaptoundekansäure	5 mM in Ethanol	Sigma
2-Propanol	zur Synthese	Merck
3-Aminopropyltriethoxysilan	reinst., $\sim 96\%$	Sigma
Aceton	zur Analyse	Merck
Ammoniak	25% zur Analyse	Sigma
Essigsäure	100% (Eisessig), reinst.	Sigma
Ethanol	reinst., 96%	Roth
Glycerin	zur Analyse	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	$\geq 99\%$	Roth
N-Hydroxysuccinimid	zur Synthese	Merck
Natriumdodecylsulfat	$\sim 96\%$	Merck
Rotisol	Ethanol wasserfrei 94%, Aceton 5%, Methylethylketon 1% (v/v)	Roth
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin	reinst., $\geq 98\%$	Sigma
Wasserstoffperoxid	30% zur Analyse	Merck

Lebenslauf

Berufserfahrung

seit 01/2008

Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand

Individuelle Edelmetall-Nanopartikel als optische Biosensoren für die DNA- und Protein-Analytik

Forschungsabteilung Nanobiophotonik

Institut für Photonische Technologien (IPHT), Jena, Thüringen

09/2007 – 12/2007

Forschungspraktikant

Chip-basierte Detektion von Biomolekülen

Jenaer BioChip Initiative (JBCI)

Institut für Photonische Technologien (IPHT), Jena, Thüringen

Akademische Ausbildung

09/2006 – 08/2007

Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Diplomand)

Bcl-6 als potentieller Transkriptionsrepressor des humanen Tumormarkers PRAME

Abteilung Zell- und Molekularbiologie

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie
- Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena, Thüringen

10/2001 – 08/2007

Studiengang: Biologie

Hochschule: Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Thüringen, Deutschland

Abschluss: Diplombiologe

Abschlussnote: 2,0 (gut)

07/2001 – 09/2001

Studienvorbereitungskurse

Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Thüringen

Wehrdienst

11/2000 – 06/2001

Wehrdienst Löberfeld-Kaserne, Erfurt, Thüringen

Stabssoldat

09/2000 – 10/2000

Grundausbildung Werratal-Kaserne, Bad Salzungen, Thüringen
Panzerschütze

Schulische Ausbildung

09/1992 – 06/2000	Pestalozzigymnasium, Greiz, Thüringen Abiturnote: gut (1,9)
03/1989 – 08/1992	Grundschule Südstadt, Hameln, Niedersachsen
09/1988 – 02/1989	Werner-Seelenbinder-Grundschule, Greiz, Thüringen

Persönliches

Name:	Schneider
Vorname:	Thomas
Geburtstag:	08. August 1981
Geburtsort:	Werdau (Sachsen)
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch



Unterschrift

Publikationsliste

Publikationen

T. Schneider, N. Jahr, A. Csáki, O. Stranik, W. Fritzsche. Localized surface plasmon resonance (LSPR) study of DNA hybridization at single nanoparticle transducers. *Biosensors Bioelectronics*, 2012 eingereicht.

A. Csáki, T. Schneider, J. Wirth, N. Jahr, A. Steinbrück, O. Stranik, F. Garwe, R. Müller, W. Fritzsche. Molecular plasmonics: light meets molecules at the nanoscale. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 369 (1950): 3431-3433, 2011.

A. Csáki, F. Jahn, I. Latka, T. Henkel, D. Malsch, T. Schneider, K. Schröder, K. Schuster, A. Schwuchow, R. Spittel, D. Zopf, W. Fritzsche. Nanoparticle Layer Deposition for Plasmonic Tuning of Microstructured Optical Fibers. *Small*, 6 (22): 2584-2589, 2010.

Internet-Zeitschrift

T. Schneider, O. Stranik, N. Jahr, A. Csáki, W. Fritzsche. Nanoparticles and DNA on Chips - Realization of a Nanobiotechnology Toolbox for Single Particle Bioanalysis. L.-G. Fleischer (Hrsg.), Berlin: *LIFIS ONLINE*, 06.09.2010.

Tagungsbandbeiträge (nur Erstautor)

T. Schneider, A. Steinbrück, M. Löchner, A. Csáki, W. Fritzsche. Sensoric applications based on plasmonic effects at metal nanoparticles. In *SPIE Proceedings*, S. Kawata, V. M. Shalaev, D. P. Tsai (Hrsg.), Plasmonics: Nanoimaging, Nanofabrication, and their Applications V, Volume 7395, 2009.

T. Schneider, O. Stranik, A. Csáki, W. Fritzsche. Noble metal nanoparticles for LSPR-based optical sensing. In *SPIE Proceedings*, H. Mohseni, M. H. Agahi, M. Razeghi (Hrsg.), Bio-sensing and Nanomedicine IV, Volume 8099, 2011.

T. Schneider, J. Wirth, F. Garwe, A. Csáki, W. Fritzsche. Plasmonic nanoparticles for bioanalytics and therapy at the limit. In *SPIE Proceedings*, (Hrsg.), Optical Sensors and Biophotonics (ACP5), Volume 8311, 2011.

Buchkapitel

N. Jahr, T. Schneider, C. Leiterer, A. Csáki, W. Fritzsche. Correlative microscopy – seeing at different angles. In Méndez-Vilas, A. & Álvarez, J. D. (Hrsg.), Volume 2, *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* (S. 1557-1564). Badajoz: Formatex Research Center, 2010.

A. Csáki, S. Berg, N. Jahr, C. Leiterer, T. Schneider, A. Steinbrück, D. Zopf, W. Fritzsche. Plasmonic Nanoparticles - Noble Material for Sensoric Applications. In P. E. Chow (Hrsg.), *Gold Nanoparticles: Properties, Characterization and Fabrication* (S. 245-261). New York: Nova Science Publishers, 2010.

Konferenzbeiträge (nur Erstautor)

T. Schneider, A. Csáki, A. Steinbrück, W. Fritzsche. Synthesis of designer metal nanoparticles for sensoric applications. *Nanobio Europe 2008*, Barcelona, Spanien, 9.-13. Juni 2008.

T. Schneider, A. Csáki, A. Steinbrück, W. Fritzsche. Synthesis of plasmonic core-shell metal nanoparticles for sensoric application. *Second Summer School: Application of multimolecular layers in chemical and biochemical sensors*, Olsztyn, Polen, 14.-26. September 2008.

T. Schneider, A. Steinbrück, M. Löchner, A. Csáki, W. Fritzsche. A biosensor based on localized surface plasmons in noble metal nanoparticles. *Molecular Plasmonics 2009*, Jena, Deutschland, 14.-16. Mai 2009

T. Schneider, A. Steinbrück, M. Löchner, A. Csáki, W. Fritzsche. An optical sensor based on localized surface plasmons in noble metal nanoparticles. *Nanobio Europe 2009*, Grenoble, Frankreich, 16.-18. Juni 2009.

T. Schneider, A. Csáki, N. Jahr, W. Fritzsche. LSPR-based biosensing with noble metal nanoparticles using single particle spectroscopy. *Functionalized Plasmonic Nanostructures for Biosensing*, Ascona, Schweiz, 18.-23. April, 2010.

T. Schneider, A. Csáki, W. Fritzsche. Noble metal nanostructures as optical biosensor for DNA hybridization. *DNA-Based MicroNano-Integration 2010*, Jena, Deutschland, 27.-29. Mai 2010.

T. Schneider, A. Csáki, W. Fritzsche. Nanoparticles and DNA on Chips - Realization of a Nanobiotechnology Toolbox for single particle bioanalytics. *Doctoral student's conference for the discussion of optical concepts (DokDoK)*, Naumburg, Deutschland, 21.-25. März 2011.

T. Schneider, O. Stranik, A. Csáki, W. Fritzsche. Noble metal nanoparticles as optical biosensor in DNA analytics. *Molecular Plasmonics 2011*, Jena, Deutschland, 19.-21. Mai 2011.

T. Schneider, O. Stranik, A. Csáki, W. Fritzsche. LSPR-based optical biosensor for DNA-analytics. *10th workshop on biosensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis (BBMEC)*, Weimar, Deutschland, 19.-22. Juni 2011.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Ich habe mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) beworben und weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt.

Jena, den 25. Mai 2012

A handwritten signature in blue ink, consisting of a series of loops and strokes, positioned above a horizontal line.

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt dabei:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Frank-Dietmar Böhmer für die Betreuung meiner Arbeit, seine fachliche Unterstützung und anhaltendes, förderndes Interesse.

PD Dr. rer. nat. Wolfgang Fritzsche für die Betreuung meiner Arbeit am IPHT, sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeiten, für die anregenden Diskussionen meiner Ergebnisse und die moralische Unterstützung.

Dr. rer. nat. Andrea Csaki für die kritische Auseinandersetzung mit meinen Ergebnissen, die Diskussionsbereitschaft bei allen fachlichen Fragestellungen und die tolle Büropartnerschaft. Ich werde den Beichtstuhl vermissen!

Norbert Jahr für die Hilfestellung bei nahezu allen technischen als auch theoretischen Problemen, die ein Biologe in der Welt der Physik so haben kann.

Dr. rer. nat. Ondrej Stranik für die theoretische Interpretation meiner Ergebnisse und die Hilfe bei der Lösung der Mie-Theorie.

Marie Löchner, Nicole Wendt und Martin Knoll für zahlreiche Stunden in der „Dunkelkammer“. Für die Auswertung der vielen „grünen Punkte“ bin ich euch besonders dankbar.

Andreas Ihring und Katrin Kandra für das Plasmaätzen meiner Glassubstrate und *Franka Jahn* für die Erstellung der REM-Aufnahmen.

Der gesamten *Abteilung Nanobiophotonik* für das stets angenehme und freundliche Arbeitsklima und die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei fachlichen als auch nicht-fachlichen Themen.

Der *DFG*, die die finanzielle Grundlage meiner Arbeit gewährleistete und dem *ESF*, die finanziell die wissenschaftlichen Kooperationen im ausländischen Partner unterstützte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die fortwährende Unterstützung bedanken. Besonders meiner Freundin *Shirin* danke ich für das richtige Maß an Ablenkung während meiner Arbeit, ihre Geduld und große Motivation vor allem in der Endphase meiner Dissertation. Asheghetam, Azizam!

